



***TOSSICITA' ED EFFETTI DELLA
METANFETAMINA***

Relatori Prof. Francesco Fornai

Candidato Dottor Silvio Paparelli

Anno Accademico 2012-2013

INDICE

1	INTRODUZIONE	1
1.1	IL SISTEMA AUTOFAGICO	1
1.1.1	<i>Autofagia e neurodegenerazione</i>	<i>5</i>
1.2	IL SISTEMA UBIQUITINA PROTEASOMA	12
1.2.1	<i>Struttura e componenti del proteasoma 26S.....</i>	<i>13</i>
1.2.2	<i>Il sistema ubiquitina proteasoma e le malattie neurodegenerative.....</i>	<i>16</i>
2	LA MALATTIA DI PARKINSON.....	17
2.1	INCLUSIONI CITOPLASMATICHE E AGGREGAZIONE PROTEICA NELLA MALATTIA DI PARKINSON	18
3	LA PROTEINA α-SINUCLEINA	23
3.1	INTERAZIONE TRA L' α -SINUCLEINA, IL SISTEMA UBIQUITINA PROTEASOMA E L'AUTOFAGIA	26
4	LA METANFETAMINA.....	29
4.1	ALTERAZIONI INDOTTE DALL'ASSUNZIONE DELLA METANFETAMINA NELL'UOMO.....	32
4.2	INDUZIONE DELLA MALATTIA DI PARKINSON DATO DALL'ABUSO DI METANFETAMINA.	35

4.3	NEUROPATOLOGIA DELLA METANFETAMINA NELL’UOMO E IN MODELLI ANIMALI	36
4.4	TOSSICITÀ DELLA METANFETAMINA	37
5	SCOPO DELLO STUDIO.....	42
6	MATERIALI E METODI.....	43
6.1	COLTURE CELLULARI	43
6.2	TRATTAMENTI FARMACOLOGICI	45
6.3	MICROSCOPIA ELETTRONICA	45
6.3.1	<i>Microscopia elettronica a trasmissione.....</i>	<i>45</i>
6.3.2	<i>Immunolettromicroscopia - Tecniche di post-inclusione.....</i>	<i>47</i>
6.1	INIBIZIONE DELL’AUTOFAGIA	49
6.2	MICROSCOPIA OTTICA A FLUORESCENZA	50
6.3	PURIFICAZIONE DEGLI INCLUSI CITOPLASMATICI	51
6.3.1	<i>Centrifugazione differenziale.....</i>	<i>51</i>
6.3.2	<i>Parametri morfologici per la valutazione degli stadi maturativi degli inclusi citoplasmatici</i>	<i>52</i>
6.4	CONTA DEGLI INCLUSI CITOPLASMATICI	53
6.5	VALUTAZIONE NUMERICA E MORFOLOGICA DEI MITOCONDRI, E DELLE CELLULE APOPTOTICHE	53
6.6	ANALISI STATISTICA	54

7	RISULTATI.....	55
7.1	RUOLO DELLA METANFETAMINA NELL'INSORGENZA DI INCLUSIONI CITOPLASMATICHE	55
7.1.1	<i>Valutazione morfologica degli inclusi citoplasmatici</i>	59
7.2	ANALISI DELLE FRAZIONI CELLULARI	64
7.3	ANALISI DELLA MORFOLOGIA DEI MITOCONDRI	68
7.4	ANALISI DELLA MORTE PROGRAMMATA PER APOPTOSI.....	70
8	DISCUSSIONE.....	75
9	BIBLIOGRAFIA.....	84

Riassunto

Introduzione. La metanfetamina (MA) è una sostanza d'abuso che induce una varietà di effetti tossici a livello centrale tra cui ansia, confusione e allucinazioni. L'esposizione alla MA risulta neurotossica per le cellule dopaminergiche del sistema nigro-striatale. Infatti la MA induce un immediato massivo rilascio di dopamina (DA) in striato, che produce stress ossidativo, portando a degenerazione i terminali dopaminergici striatali e alla conseguente riduzione dei livelli di DA in striato. I corpi cellulari della substantia nigra pars compacta (SNpc) vengono distrutti per dosi elevate di MA. Prima di andare incontro a morte nel loro citoplasma è possibile osservare strutture multi lamellari e inclusioni positive per proteine quali l'ubiquitina e l' α -sinucleina. Quest'ultima proteina in presenza di specie reattive dell'ossigeno forma aggregati, tossici per la cellula. Inclusioni citoplasmatiche positive per l' α -sinucleina e per le proteine del sistema Ubiquitina Proteasoma (UP) sono presenti anche nella malattia degenerativa nota come malattia di Parkinson (Mdp) che pertanto viene parzialmente mimata dalla tossicità da MA.

Un altro effetto prodotta dalla MA consiste nella presenza di vacuoli autofagici nel citoplasma che derivano dall'accumulo di corpi autofagici prodotti in eccesso ma non smaltiti. L'autofagia infatti viene reclutata in

maniera compensatoria in seguito a somministrazione di MA. Questo avviene come conseguenza del danno proteico e mitocondriale indotto dalla dopamina ossidata che si forma in quantità drammatica durante l'effetto indotto da MA. L'autofagia rappresenta fisiologicamente la più importante via di rimozione di proteine alterate e organuli danneggiati. Questi vengono avvolti da membrane a doppio filamento (gli autofagosomi) provenienti dal Golgi e dal reticolo endoplasmatico. Successivamente gli autofagosomi vengono avviati ai lisosomi dove si compie la completa degradazione degli organuli e delle proteine alterate.

Ad oggi non è ancora chiaro quale sia il ruolo giocato dall'autofagia nella neurodegenerazione ed esistono molte ipotesi a riguardo. Ad esempio, l'inibizione dell'autofagia *in vivo* provoca un accumulo di inclusioni positive per l'ubiquitina e neurodegenerazione. Inoltre, la stimolazione dell'autofagia contribuisce alla rimozione di aggregati multiproteici e di mitocondri alterati prevenendo l'apoptosi. D'altro canto un'eccessiva autofagia provoca il cannibalismo della cellula stessa mediante un processo noto come morte cellulare autofagica.

Scopo dello studio. Alla luce di questi dati, lo scopo di questo studio è stato quello di indagare da un punto di vista ultrastrutturale gli effetti indotti dalla MA a livello subcellulare. Questo studio in particolare vuole indagare i correlati morfologici relativi al ruolo svolto dall'autofagia nella tossicità da

MA, in modo da comprendere se essa svolga una funzione protettiva o viceversa contribuisca alla morte cellulare. A questo scopo sono state utilizzate cellule dopaminergiche che venivano trattate con MA, in queste cellule sono stati studiati i vari compartimenti sub cellulari sia in modo qualitativo che quantitativo e in particolare si è valutato in modo dose e tempo dipendente:

- 1) alterazioni di specifiche proteine
- 2) alterazioni dei vacuoli autofagici
- 3) alterazioni mitocondriali
- 4) insorgenza di morte cellulare con particolare attenzione all'apoptosi

Metodi. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando la linea cellulare PC12 in grado di sintetizzare e metabolizzare la DA.

Per lo studio degli effetti tossici della MA le cellule sono state trattate con dosi crescenti di MA (0,001-1 μ M) per 4, 12, 24 72 e 168 ore.

Al termine di ogni trattamento, le cellule sono state processate per l'analisi ultrastrutturale e immunocitochimica mediante microscopia elettronica a trasmissione.

Allo scopo di caratterizzare le inclusioni citoplasmatiche che si formano dopo esposizione a MA, i campioni sono stati processati come segue:

- centrifugazioni successive aumentando ad ogni passaggio il valore di campo centrifugo applicato, in modo da isolare ad ogni passaggio una frazione cellulare specifica;
- analisi al microscopio elettronico a trasmissione delle singole frazioni

Alcuni esperimenti sono stati effettuati utilizzando microscopia confocale con tecniche di immunoistochimica. Tali esperimenti hanno indagato l'accumulo di α -sinicleina nei vacuoli autofagici o l'insorgenza di apoptosi in seguito a blocco della via autofagica con 3-metiladenina. Questi esperimenti corredati da analoghi studi ultrastrutturali hanno analizzato il ruolo detrimentalmente del blocco dell'autofagia nella tossicit  indotta da MA.

Risultati: L'esposizione delle cellule PC12 alla MA determina la comparsa di inclusioni citoplasmatiche in modo dose e tempo dipendente ($3,50 \pm 0,10$ inclusi per cellula a 4 ore contro $14,65 \pm 0,55$ a 72 ore, per MA $1 \mu\text{M}$). La dose di MA $1 \mu\text{M}$ a 72 ore induce un aumento significativo del numero di mitocondri alterati per cellula e anche un aumento di cellule apoptotiche rispetto al controllo. Le inclusioni citoplasmatiche nei diversi tempi d'esposizione si presentano con caratteristiche morfologiche diverse. A tempi precoci (4-24 ore) le inclusioni sono costituite da strati concentrici di membrana a doppio filamento, quindi le membrane si fondono e si forma una porzione

centrale elettrondensa. Questi stessi inclusi sono positivi per anticorpi diretti contro l' α -sinucleina, le proteine che appartengono al sistema UP e al sistema autofagico. Per valutare il significato funzionale (compensatorio o tossico) sostenuto dall'attivazione endogena dell'autofagia durante MA abbiamo bloccato tale attivazione tramite 3 metiladenina che ha determinato un drammatico peggioramento degli effetti tossici indotti da MA, delineando un chiaro significato protettivo dell'autofagia endogena. I risultati ottenuti hanno consentito una ulteriore analisi delle inclusioni indotte da MA.

Mediante centrifugazione differenziale è stato possibile isolare tre frazioni cellulari, ognuna caratterizzata da un tipo di organulo cellulare (nuclei, mitocondri, microsomi) e da inclusioni citoplasmatiche. In particolare, ogni frazione conteneva inclusioni citoplasmatiche prevalentemente di un determinato tipo morfologico, espressione di uno specifico stadio maturativo. La frazione con maggiore densità di inclusi è quella mitocondriale ($0,544 \pm 0,015$ inclusi per μm^2) contenente inclusioni allo stadio maturativo intermedio ($62,48\% \pm 1,15$).

Conclusioni.

- La metanfetamina incrementa i vacuoli autofagici in cellule dopaminergiche

- La metanfetamina induce alterazioni mitocondriali in cellule dopaminergiche
- La metanfetamina produce internalizzazione dei mitocondri alterati all'interno dei vacuoli autofagici.
- La metanfetamina induce aggregati di proteine misfolded (α -sinucleina)
- La metanfetamina produce internalizzazione delle proteine misfolded nei vacuoli autofagici
- Mitocondri e proteine misfolded ingolfano il sistema autofagico
- L'ingolfamento dell'autofagia provoca la morte cellulare per apoptosi

1 Introduzione

Nelle cellule eucariotiche esistono due tipi principali di sistemi atti alla rimozione di proteine alterate (proteine *mis/unfolded*); il sistema autofagico e il sistema ubiquitina-proteasoma (UP). Il sistema UP è deputato alla rimozione di proteine con una breve emivita (Schwartz e Ciechanover, 2009), mentre il sistema autofagico è specifico per le proteine che hanno una emivita più lunga (Schworer *et al.*, 1981). Tuttavia, molte proteine, come l' α -sinucleina vengono degradate indifferentemente da entrambe le vie (Webb *et al.*, 2003). Inoltre, l'autofagia è un sistema degradativo preposto anche alla rimozione di organelli danneggiati, come i mitocondri (Klionsky e Emr, 2000).

1.1 Il sistema autofagico

L'autofagia consiste nella degradazione per via lisosomiale di componenti citoplasmatici alterati e a seconda dei meccanismi attivati viene distinta in tre forme diverse; la macroautofagia, la microautofagia e l'autofagia mediata dalla chaperonine (Eskelinen, 2005).

Nella macroautofagia, detta anche semplicemente autofagia, le porzioni citoplasmatiche che devono essere degradate vengono avvolte

da un sistema di membrane a doppio strato che successivamente si fondono con endosomi e lisosomi. Nella microautofagia i lisosomi stessi sequestrano una porzione di citoplasma attraverso un processo che ricorda la fagocitosi. Nell'autofagia mediata dalle chaperonine le proteine con una sequenza segnale specifica vengono trasportate dal citoplasma verso le membrane del lisosoma e quindi all'interno del lisosoma.

In particolare la (macro)autofagia non è costitutivamente attiva, ma viene attivata dalla carenza di risorse energetiche (glucosio ed aminoacidi), di fattori di crescita e di ormoni. Inoltre il fosfatilinositolo 3 fosfato chinasi (PI3-k III) e mTor (mammalian Target of Rapamycin) rappresentano dei modulatori dell'autofagia (Eskelinen, 2005).

Dopo un segnale attivatore intere porzioni citoplasmatiche e organelli vengono sequestrate all'interno di strutture a doppia membrana che costituiscono il fagoporo il quale chiudendosi forma un vacuolo detto autofagosoma.). Nei lieviti le membrane che formano il fagoporo derivano da un pool detto Pre-Autophagosomal Structure (PAS), mentre nei mammiferi i pool di membrane non sono stati ancora ben identificati, ma si presuppone che essi derivino dal reticolo endoplasmatico e/o dal trans-Golgi. Il fagoporo contiene una varietà di proteine tra cui l'ATG 9 che lega i lipidi necessari per l'accrescimento

delle membrane e il PI3-K III, omologo del VPS34 del lievito, che catalizza la formazione del fosfatidil inositolo 3 fosfato, una molecola essenziale per il reclutamento di proteine necessarie per la formazione dell'autofagosoma (Marino e Lopez-Otin, 2004; Obara *et al.*, 2008).

Studi nel lievito hanno dimostrato l'esistenza di vari complessi multienzimatici che coinvolgono il Vps34 di cui quello formato con la proteina beclin 1 risulta direttamente coinvolto con le prime fasi del processo autofagico. Beclin 1 interagisce sia con Bcl-2, riducendo così la capacità di legarsi a Vps 34, con UVRAG (UV irradiation resistance-associated gene) e Ambra 1, gli ultimi regolatori positivi dell'autofagia (Patingre *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2007; Fimia *et al.*, 2007).

Nella formazione del vacuolo autofagico è coinvolta anche la proteina LC3 (Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3) che normalmente è associata ai microtubuli e partecipa alle dinamiche del citoscheletro. Quando inizia la formazione dell'autofagosoma, la proteina LC3 si dissocia dai microtubuli e viene convertita dalla forma inattiva LC3 I a quella attiva LC3 II che interagisce con la membrana dell'autofagosoma.

In un secondo passaggio l'autofagosoma si fonde con l'endosoma, formando l'anfisoma che, successivamente, si fonde con il lisosoma i cui enzimi litici provvederanno alla degradazione del materiale fagocitato (Eskelinen, 2005).

La via appena descritta è quella preferenzialmente seguita ma non è l'unica. Una via alternativa consiste nella fusione diretta dell'autofagosoma con il lisosoma (Figura 1.1). In questo caso però l'efficienza autofagica risulta essere minore rispetto alla via precedentemente descritta dal momento che, mancando il preliminare processo di fusione tra l'autofagosoma e gli endosomi, diminuisce la quantità di enzimi litici e proteasi che al termine si ritroveranno nell'autofagolisosoma. Questa minore concentrazione enzimatica riduce l'efficacia della degradazione del materiale fagocitato.

La fusione dell'autofagosoma con il lisosoma è un processo mediato da un complesso di proteine tra cui le proteine che legano il GTP della famiglia Rab. Tra queste Rab22 e Rab 24 sono necessarie per una corretta maturazione dell'autofagosoma (Munafo e Colombo, 2002; Marino e Lopez-Otin, 2004).

Come detto in precedenza, la carenza di substrati metabolici extracellulari induce l'autofagia inibendo le reazioni anaboliche come la sintesi di proteine e lipidi.

Altri fattori che possono indurre l'attivazione della via autofagica consistono nella presenza all'interno della cellula di aggregati proteici, proteine danneggiate e/o malfunzionanti ed organelli alterati.

Uno dei modulatori negativi della via autofagica è la proteina chinasi mTOR (mammalian Target of Rapamycin) che agisce come sensore della presenza di nutrienti ed attiva la sintesi proteica inibendo al contempo

l'autofagia (Lum *et al.*, 2005). mTOR viene attivata quando i livelli intracellulari di inositolo 1,4,5 trifosfato (IP₃) aumentano per effetto della presenza di nutrienti (Petiot *et al.*, 2000).

Al contrario, quando si riducono i livelli intracellulari di IP₃, mTOR viene inibita con conseguente attivazione dell'autofagia (Arico *et al.*, 2001). Un'attivazione della via autofagica si ha anche quando viene bloccata l'attività della inositolo monofosfatasi (IMPasi) che ha come effetto finale quello di aumentare i livelli intracellulari dell'IP₃ (Criollo *et al.*, 2007).

1.1.1 Autofagia e neurodegenerazione

Attualmente l'autofagia viene considerata come un'importante via degradativa intracellulare e il suo ruolo è stato studiato nella patogenesi di molte malattie neurodegenerative quali la malattia di Parkinson (MdP), la malattia di Huntington e la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) (Anglade *et al.*, 1997; Ravikumar *et al.*, 2004; Ravikumar *et al.*, 2008; Qin *et al.*, 2003; Fornai *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Morimoto *et al.*, 2007). Inoltre, studi recenti hanno dimostrato che nel sistema nervoso centrale l'inibizione dell'autofagia in condizioni basali, cioè senza stimoli tossici, causa degenerazione soprattutto a livello delle cellule del Purkinjie (Hara *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2006).

D'altra parte in condizioni fisiologiche l'autofagia è attiva, anche se in maniera ridotta, e questo permette la rimozione di proteine e organuli danneggiati. Quando questa attività è parzialmente funzionante i componenti alterati del citoplasma si accumulano causando un danno cellulare e alla fine apoptosi (Klionsky e Emr, 2000; Ravikumar *et al.*, 2004).

Pertanto l'autofagia deve essere considerata come un sistema in grado di mantenere l'omeostasi cellulare, che contribuisce al turn over di proteine e organelli per mantenere la normale fisiologia della cellula.

A sostegno di questa ipotesi bisogna ricordare che l'autofagia è un processo altamente conservato nel corso della filogenesi e altamente regolato.

Il coinvolgimento dell'autofagia nella MdP è stato dimostrato per la prima volta da Anglade e collaboratori nel 1997 (Anglade *et al.*, 1997). Questi autori descrissero nei neuroni dopaminergici di pazienti affetti da MdP, accanto a cellule apoptotiche, anche modificazioni ultrastrutturali tipiche dell'autofagia. Infatti nella substantia nigra pars compacta di reperti autoptici provenienti da questi pazienti furono osservati vacuoli simili a lisosomi e il reticolo endoplasmatico vacuolato. Inoltre nei neuroni dopaminergici della substantia Nigra di pazienti affetti da MdP gli autofagosomi che contengono vestigia mitocondriale sono positivi per i marcatori degli endosomi (Zhu *et al.*, 2003).

Molti studi hanno dimostrato che proteine codificate da geni coinvolte nella MdP interagiscono con il sistema autofagico.

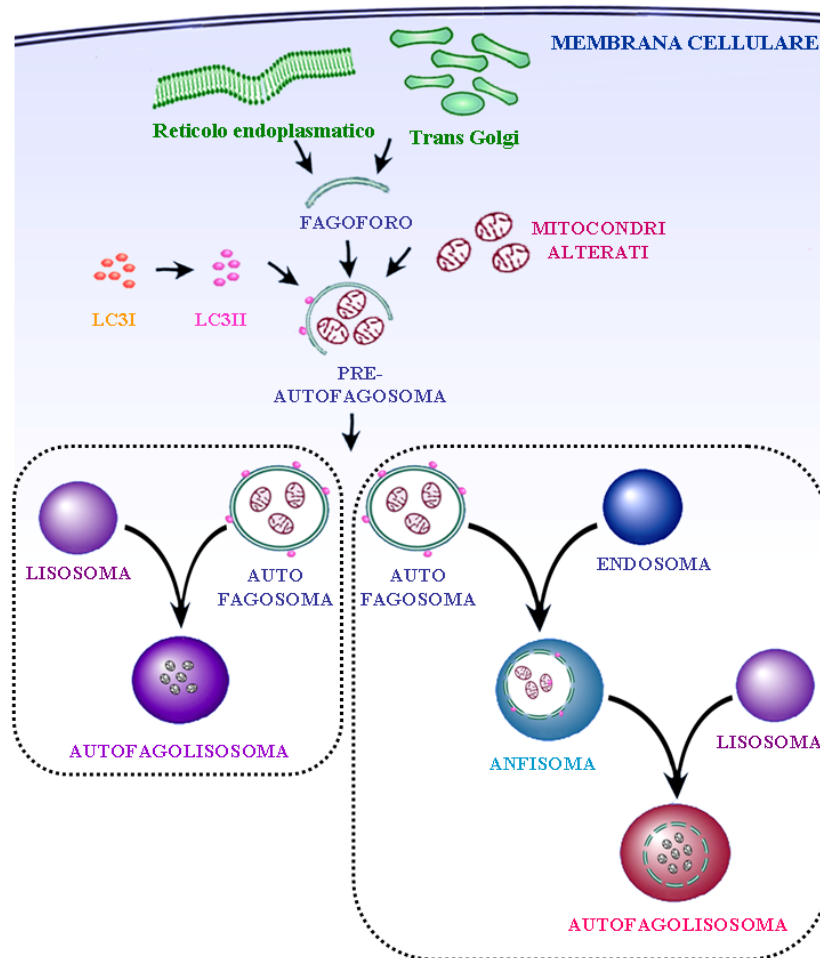


Figura 1.1. La via autofagica

Nelle fasi iniziali dell'autofagia strutture a doppia membrana che derivano dal reticolo endoplasmatico e/o dal trans-Golgi danno origine al fagoforo che sequestra porzioni citoplasmatiche. Tale struttura chiudendosi darà origine ad un vacuolo detto autofagosoma a cui si associa la forma attivata della proteina LC3 (LC3 II).

L'autofagosoma potrà seguire due vie:

1. fondersi con il lisosoma andando a costituire l'autofagolisosoma;
2. fondersi con l'endosoma generando l'anfisoma che successivamente fondendosi con il lisosoma formerà l'autofagolisosoma.

Questo è il caso della proteina parkina e pink 1 la cui mutazione è responsabile di MdP familiare (Kitada *et al.*, 1998; Valente *et al.*, 2004). Recentemente è stato dimostrato che entrambe le proteine sono coinvolte nel regolare l'autofagia dei mitocondri alterati. In questo studio condotto in vitro sembra che la parkina sia reclutata dai mitocondri alterati che sono rimossi successivamente da pink 1 e in questo modo avviati all'autofagia (Narendra *et al.*, 2008). Un ulteriore studio ha dimostrato che anche i geni DJ1 e sinfilina la cui mutazione induce MdP partecipano all'autofagia. L'attività di DJ1 è critica per mTOR e per il processamento di LC3, mentre la sinfilina è importante per la formazione del fagoporo (Vasseur *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2008).

Per quanto riguarda il coinvolgimento dell'autofagia nella patogenesi della SLA molte sono state le ipotesi che hanno cercato di spiegarne l'esatto ruolo. Da un lato si è ipotizzato che la neurodegenerazione osservata nella SLA dipendesse da un eccesso di attivazione della via autofagica rispetto ai livelli basali (Morimoto *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008).

Un'ipotesi alternativa è invece quella secondo la quale la degenerazione dei motoneuroni nella SLA sia la conseguenza di un blocco di tale via, con il conseguente accumulo di proteine coinvolte nella cascata autofagica. In tal caso l'autofagia rivestirebbe un chiaro ruolo protettivo a livello dei motoneuroni tanto che una alterazione della sua normale progressione sarebbe causa di neurodegenerazione.

A sostegno di questa ipotesi, recenti studi hanno dimostrato che una inibizione o una parziale inattivazione della via autofagica possono portare ad un aggravamento dei processi neurodegenerativi (Hara *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2006) per effetto di un accumulo intracellulare di proteine *misfolded* depositate sottoforma di aggregati potenzialmente tossici per la cellula.

A tale proposito, Kabuta e collaboratori, utilizzando colture cellulari esprimenti il gene che codifica per la superossido-dismutasi di tipo 1 (SOD1) umana mutata, sono riusciti a dimostrare per la prima volta che un blocco dei sistemi degradativi intracellulari, come la via autofagica e il sistema ubiquitina-proteasoma, determina l'accumulo della SOD1 sottoforma di aggregati proteici insolubili causando morte cellulare. Questo risultato dimostra per la prima volta che l'autofagia può rivestire un ruolo critico nella degradazione delle proteine intracellulari alterate impedendone un eventuale accumulo ed esplicando quindi un chiaro effetto neuroprotettivo (Kabuta *et al.*, 2006).

Oltre alla SOD1, anche gli aggregati di α -sinucleina sono substrato della via autofagica (Cuervo *et al.*, 2004) ed il loro accumulo è stato riscontrato nelle inclusioni neuronali di topi utilizzati come modello sperimentale di SLA (Morrison *et al.*, 1996; Fornai *et al.*, 2008) e di MdP (Fornai *et al.*, 2004).

La via autofagica svolge un importante ruolo nel turn-over degli organelli danneggiati tra cui i mitocondri.

In alcuni modelli animali di SLA è stato osservato che la degenerazione dei motoneuroni è accompagnata da un aumento di mitocondri morfologicamente alterati e riccamente vacuolati per effetto dello slargamento delle creste (Martin *et al.* 2007; Fornai *et al.*, 2008). L'analisi ultrastrutturale condotta sempre in topi SLA ha rivelato che tali mitocondri alterati si trovano all'interno di vacuoli autofagici presenti nei motoneuroni in degenerazione (Fornai *et al.*, 2008).

Pertanto, varie evidenze indicano l'esistenza di una stretta associazione tra il blocco della via autofagica e la neurodegenerazione. Per tale motivo il potenziamento di questa via potrebbe produrre effetti benefici in in molte patologie neurodegenerative.

A tal proposito, ad esempio il litio, composto ampiamente utilizzato come stabilizzatore dell'umore, se somministrato a basse dosi si è rivelato essere un potente induttore della via autofagica (Sarkar *et al.*, 2005; Fornai *et al.*, 2008).

1.2 Il sistema ubiquitina proteasoma

Il sistema ubiquitina-proteasoma (UP) è responsabile della degradazione di molte proteine cellulari (Coux *et al.*, 1996; Rock *et al.*, 1994), tranne quelle di membrana ed extracellulari le quali, dopo endocitosi, vengono degradate nei lisosomi (Sherman e Goldberg, 2001). Inoltre, anche le proteine misfolded, mutate e/o danneggiate dallo stress ossidativo sono degradate da questo sistema. Per essere degradate le proteine vengono prima riconosciute e segnate tramite una catena di poliubiquitina, la quale si forma mediante legami covalenti di molecole di ubiquitina ad un residuo di lisina presente nel substrato. La proteina poliubiquitinata è poi degradata da un grosso complesso proteolitico, il proteasoma 26S (Figura 1.2). La monoubiquitinazione, dall'altro lato, regola la trascrizione, la traduzione, il traffico proteico, la riparazione del DNA e numerose altre funzioni cellulari. La poliubiquitinazione di una proteina target è compiuta da una serie di reazioni enzimatiche che sono necessarie per assicurare la specificità e l'attivazione dell'ubiquitina. Per prima cosa, l'ubiquitina viene attivata dall'enzima attivante l'ubiquitina (E1), che forma un legame tioestere tra un residuo di cisteina e la glicina carbossi-terminale dell'ubiquitina, con un meccanismo ATP-dipendente (Hochstrasser, 1996). L'ubiquitina così attivata viene trasferita ad uno dei tanti carrier proteici per l'ubiquitina o agli enzimi coniuganti l'ubiquitina (E2s), tramite la

formazione di un altro legame tiolico. Infine, l'ubiquitina viene legata ad un residuo di lisina della proteina substrato, che è specificamente legata alla ligasi E3, la parkina. Altre molecole di ubiquitina attivate possono essere attaccate a residui di lisina interni dell'ubiquitina così da formare catene di poliubiquitina, le quali poi agiscono da segnale di degradazione, che viene riconosciuto dal complesso del proteasoma 26S. Sono necessarie almeno quattro molecole di ubiquitina per una segnalazione efficiente al proteasoma.

1.2.1 Struttura e componenti del proteasoma 26S

Il sistema del proteasoma è presente nel citoplasma, nella regione perinucleare e nel nucleo di tutte le cellule eucariotiche. Nel citoplasma, i proteasomi sono associati ai centrosomi, al complesso del citoscheletro ed alla superficie esterna del reticolo endoplasmatico. Nel nucleo sono presenti in tutto il nucleoplasma ma non nel nucleolo. L'indebolimento del sistema proteolitico comporta l'accumulo dei proteasomi in questi compartimenti cellulari, con la formazione di aggregati. Quelli localizzati intorno ai centrosomi vengono chiamati "aggreosomi". La funzione degli aggreosomi è quella di indebolire le funzioni del proteasoma e promuovere l'apoptosi (Wojcik e DeMartino, 2003). Il proteasoma 26S consiste di un *core* catalitico, costituito dalla subunità 20S. Quest'ultima è composta da 28 subunità assemblate in modo tale da formare

degli anelli eptamerici, due interni e due esterni, associati a dare una struttura cilindrica cava all'interno della quale avviene la proteolisi (DeMartino e Slaughter, 1999). I due anelli più interni del proteasoma 20S sono composti ognuno da sette subunità diverse. I tre differenti siti catalitici (siti idrolitici ad azione chimitripsino-simile, tripsino-simile e peptidilglutamil-peptide) del proteasoma si trovano sulla superficie interna degli anelli più interni, in modo tale da impedire una indiscriminata degradazione delle proteine. Gli anelli più esterni, non catalitici, composti da sette subunità α diverse, fungono da ancora per il 19S (PA700), una ATPasi formata da varie subunità, che contiene l'attivatore o il regolatore del proteasoma. Il complesso 19S determina la specificità del substrato e consiste di almeno sei ATPasi e più di 15 subunità aggiuntive, che non sono in grado di legare l'ATP. Il complesso regolatorio 19S svolge almeno tre importanti funzioni: apre selettivamente il canale attraverso la subunità 20S, distende le proteine ubiquitinate per permettere loro di entrare nel *core* catalitico e rimuove la catena di poliubiquitina dal substrato. I prodotti di degradazione che derivano dalla catalisi del proteasoma sono peptidi di piccola taglia e aminoacidi, che possono essere riciclati per produrre nuove proteine. Allo stesso tempo, le catene di poliubiquitina, rilasciate dalle proteine segnate per la degradazione, sono poi disassemblate ad opera di idrolasi ubiquitina carbossi-terminale (UCH-L1), per produrre molecole monomeriche di ubiquitina che possono essere così riutilizzate.

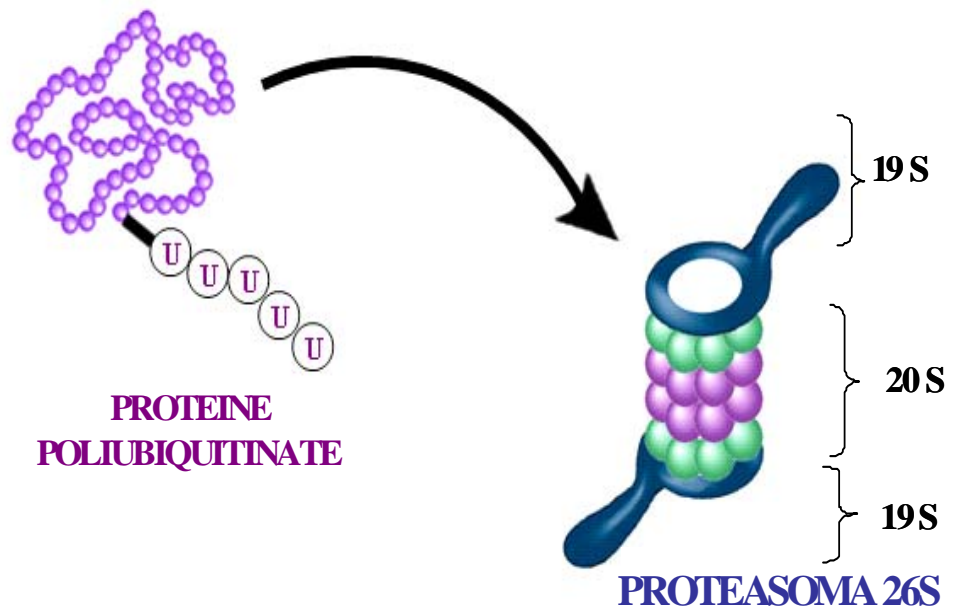


Figura 1.2. Il sistema ubiquitina-proteasoma. Le proteine *misfolded* o alterate sono ubiquitinate e degradate dai complessi del proteasoma. I monomeri di ubiquitina (Ub) si legano covalentemente al substrato. Il complesso del proteasoma 26S degrada i coniugati ubiquitina-proteina.

1.2.2 Il sistema ubiquitina proteasoma e le malattie neurodegenerative

La degradazione proteica è uno dei meccanismi più importanti che regola i livelli di proteine cellulari coinvolte in processi fondamentali come il ciclo cellulare, lo sviluppo, la crescita, la trascrizione, le vie di trasmissione dei segnali e la processazione dell'antigene (DeMartino e Slaughter, 1999). Inoltre, la degradazione delle proteine sembra essere un importante meccanismo difensivo delle cellule nei confronti delle proteine tossiche, l'accumulo delle quali potrebbe gravemente compromettere le normali funzioni e la vitalità cellulare. Il sistema UP è implicato nella detossificazione e nella segnalazione di proteine danneggiate che devono essere degradate. In condizioni di stress, il sistema UP potrebbe essere alterato sia direttamente che indirettamente. Il risultato di questa alterazione provocherebbe l'accumulo di proteine tossiche, che potrebbero portare a disfunzione e morte cellulare (Fornai *et al.*, 2003). Infatti varie malattie neurodegenerative sono caratterizzate dall'accumulo di proteine aggregate come la sostanza fibrillare β -amiloide nella malattia di Alzheimer, o l'accumulo di α -sinucleina nella Malattia di Parkinson o le sequenze ripetute di poliglutamina nella malattia di Huntington (Ciechanover e Brundin, 2003).

2 La Malattia di Parkinson

La malattia di Parkinson (MdP) è una delle più comuni malattie neurodegenerative che colpiscono circa l'1% della popolazione al di sopra dei sessanta anni. I sintomi di questa malattia furono descritti per la prima volta dal neurologo inglese James Parkinson, che nel 1817 parlò di “paralisi agitante”. Infatti i principali sintomi di questa malattia sono di tipo motorio e consistono in tremore a riposo, rigidità, ipo- e bradicinesia e anomalie posturali.

Questi sintomi sono causati dalla perdita di dopamina nel corpo striato, area cerebrale bersaglio dei neuroni dopaminergici della substantia nigra pars compacta (SNpc), la cui degenerazione progressiva rappresenta la principale caratteristica patologica della MdP (Crossman, 1989; DeLong, 1990; Greenamyre, 1993).

I sintomi motori possono essere accompagnati da disturbi autonomici che riguardano principalmente il sistema cardiovascolare, gastrointestinale e urinario, oltre ad alterazioni di funzioni omeostatiche legate alla termoregolazione come la sudorazione. Inoltre, tra i pazienti affetti da MdP vi è un'alta incidenza di depressione e alterazioni cognitive.

Si ritiene che i sintomi non motori di tipo autonomico siano dovuti alla degenerazione di aree cerebrali diverse dalla SNpc, come il locus coeruleus, il

nucleo motore dorsale del nervo vago e la formazione reticolare del ponte e del mesencefalo.

Infine, la neurodegenerazione a livello corticale e dei nuclei basali del proencefalo, possono rendere conto del declino cognitivo osservato nei pazienti ammalati di MdP.

2.1 Inclusioni citoplasmatiche e aggregazione proteica nella Malattia di Parkinson

Una caratteristica patologica della MdP è la presenza di inclusioni citoplasmatiche dette corpi di Lewy (LB) dal nome di colui che per primo le descrisse come strutture debolmente eosinofile all'interno dei nuclei basali di pazienti parkinsoniani (Lewy, 1912). Oggi sappiamo che i LB consistono in aggregati eterogenei di lipidi e proteine che si ritrovano nel citoplasma dei neuroni dopaminergici della SNpc che sono stati risparmiati dai processi neurodegenerativi, nei neuroni della corteccia cerebrale e nei nuclei colinergici del proencefalo basale (Braak *et al.*, 1995).

I lipidi occupano la porzione centrale delle inclusioni, il *core*, mentre gli elementi filamentosi sono localizzati alla periferia e possono comprendere proteine e neurofilamenti.

Al microscopio ottico si presentano come inclusioni citoplasmatiche debolmente eosinofile di aspetto prevalentemente sferico. Al microscopio elettronico si identificano due tipi di LB (Roy e Wolman. 1969; Arima *et al.*,1998).

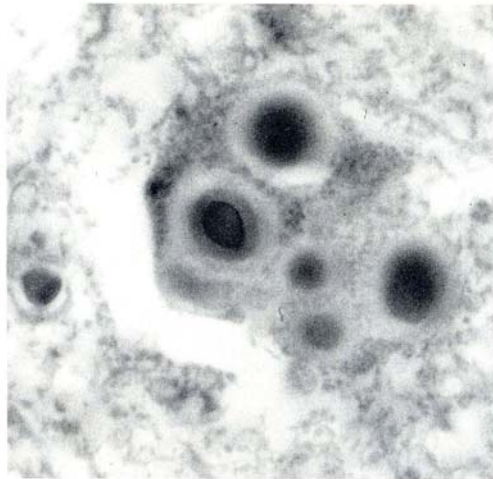


Figura 2.1 Immagine di microscopia elettronica di una cellula nervosa contenente corpi di Lewy nel citoplasma.

Il più comune è costituito da materiale granulare localizzato prevalentemente nel *core* che appare fortemente elettrondenso, circondato da un alone pallido costituito da materiale fibrillare radiale; il secondo tipo (LB corticale) risulta costituito prevalentemente da materiale fibrillare ed è tipico di quei LB che al microscopio ottico appaiono di densità uniforme. (Schults, 2006; Forno, 1996).

La componente più abbondante dei corpi di Lewy è una proteina chiamata α -sinucleina, considerata il marker specifico di tali inclusioni (Spillantini *et al.*, 1997). Tuttavia, i corpi di Lewy contengono anche molte altre proteine, tra cui varie componenti del sistema UP (Meredith *et al.*, 2004).

Nonostante i LB siano caratteri distintivi della MdP non sono ancora chiari i meccanismi attraverso i quali questi aggregati proteici si formino e il loro significato patologico.

Ad esempio, se in una cellula si ha un'alterazione della capacità di degradare proteine anormali, mutate o ossidate, o sovraesprese, queste possono accumularsi (Sherman e Goldberg, 2001). In questo modo, una riduzione o una inibizione dell'attività dei sistemi di degradazione può essere responsabile della formazione di aggregati proteici, oppure, questi stessi aggregati potrebbero indebolire i sistemi di degradazione proteica.

Mutazioni nel gene dell' α -sinucleina sono state associate a casi familiari di MdP (Polymeropoulos *et al.*, 1997). Oltre all' α -sinucleina, anche mutazioni nei geni di altre proteine coinvolte nel sistema UP, come la parkina, il DJ-1 e l'ubiquitina idrolasi carbossi-terminale L1 (UCH-L1), hanno mostrato un legame con casi ereditari di MdP (Chung *et al.*, 2003), rafforzando l'ipotesi del coinvolgimento del sistema UP nella patogenesi della MdP. Recenti studi hanno dimostrato che proteine che tendono ad aggregarsi, come l'huntingtina

mutata e l' α -sinucleina mutata, possono inibire il sistema UP (Bence *et al.*, 2001; Snyder *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2001).

Inoltre, disfunzioni mitocondriali dovute all'inibizione del complesso I della catena di trasporto degli elettroni, implicate nella patogenesi della MdP (Greenamyre *et al.*, 2003), producono un deficit di ATP che sembra responsabile della riduzione dell'attività del sistema UP e quindi dell'accumulo intracellulare di proteine alterate e potenzialmente tossiche (Hoglinger *et al.*, 2003). Infatti, nelle cellule dopaminergiche il metabolismo della dopamina e la sua autossidazione rappresentano fisiologicamente fonti di stress ossidativo, che potrebbe aumentare selettivamente la loro vulnerabilità nei confronti di varie tossine ambientali (McNaught e Jenner, 2001).

La domanda importante, alla quale si deve ancora rispondere, è se le inclusioni proteiche simili ai corpi di Lewy siano nocive per i neuroni e portano alla loro degenerazione, o siano protettive, visto che sequestrano le proteine anormali tossiche, evitando che i meccanismi cellulari sensibili a queste risultino danneggiati. Una ipotesi è che l'accumulo di proteine tossiche nel citoplasma (per esempio l' α -sinucleina nella MdP e l'huntingtina nella malattia di Huntington), vengano racchiusi in aggregati come misura protettiva (Ciechanover e Brundin, 2003). Tuttavia, l'eccessivo accumulo di aggregati può essere tossico per le funzioni cellulari, perché potrebbe iniziare un processo che alla fine porta la cellula a morte.

La correlazione tra la formazione dei LB e la disfunzione nei sistemi di detossificazione cellulari è stato dimostrato anche dal fatto che anche il sistema autofagico risulta implicato (Ferrucci *et al.*, 2008b). Infatti un deficit nell'enzima lisosomiale catepsina D porta all'accumulo di aggregati di α -sinucleina, mentre una sua overespressione riduce gli stessi aggregati (Beyer *et al.*, 2009)

3 La proteina α -sinucleina

L' α -sinucleina, appartiene ad una famiglia di proteine che comprende anche la β - e la γ -sinucleina. L' α -sinucleina è una proteina presinaptica che rappresenta lo 0,5-1,0% di tutte le proteine citosoliche dell'encefalo la cui funzione non è stata ancora chiarita (Iwai *et al.*, 1995).

L'interesse che questa proteina suscita è dovuto al suo diretto coinvolgimento in molte malattie neurodegenerative che, per questo, prendono il nome di "sinucleinopatie". Infatti la mutazione del gene che codifica per questa proteina è coinvolta nella MdP familiare, nella demenza a corpi di Lewy (DLB), nel il morbo di Huntington, nella demenza fronto-temporale e nella sindrome di Down (Charles *et al.*, 2000; Jellinger, 2003; Dev *et al.*, 2003). Inoltre anche la forma non mutata dell' α -sinucleina risulta essere neurotossica se è sovraespressa (Mosharov *et al.*, 2006). Sebbene la sua funzione non sia ancora stata ben compresa, è stato dimostrato mediante analisi ultrastrutturale con microscopia elettronica che l' α -sinucleina interagisce con le vescicole sinaptiche e sembra coinvolta nel rilascio di neurotrasmettitori (Eliezer *et al.*, 2001), nella plasticità sinaptica (Murphy *et al.*, 2000) e nel trasporto vescicolare all'interno dei neuroni (Abeliovich *et al.*, 2000). Studi su topi α -sinucleina knockout indicano che sebbene l' α -sinucleina non sia indispensabile per il normale sviluppo del sistema nervoso (Abeliovich *et al.*,

2000), possa essere comunque coinvolta nella regolazione a lungo termine e nel mantenimento della funzione presinaptica (Chandra *et al.*, 2004) e in particolare sia necessaria per la genesi, la localizzazione e/o il mantenimento di alcune delle vescicole che rappresentano il pool di riserva presinaptico (Cabin *et al.*, 2002).

Dal punto di vista strutturale, l' α -sinucleina è formata da 140 aminoacidi ed è costituita da tre distinte regioni: una regione N-terminale anfipatica (1-60), una regione intermedia idrofobica (NAC) contenente la componente β non amiloide (61-95) ed una regione C-terminale (96-140). In seguito al legame con i fosfolipidi di membrana, la regione N-terminale dell' α -sinucleina converte la sua struttura secondaria, passando da circa il 3% ad oltre il 70% di α -eliche. Inoltre la regione NAC è altamente amiloidogena e conferisce alla proteina la capacità di modificarsi a formare foglietti β (Serpell *et al.*, 2000; El-Agnaf e Irvine, 2000). Infine, la regione C-terminale rimane distesa e non si lega alle vescicole (Eliezer *et al.*, 2001).

La forma normale dell' α -sinucleina è monomerica, ma ad alte concentrazioni può polimerizzare in filamenti, che poi partecipano alla formazione di inclusioni citoplasmatiche note come corpi di Lewy (LB) (Dawson *et al.*, 2002; Giasson e Lee, 2003; Goedert, 2001). La presenza di α -sinucleina, ubiquitina e altre subunità del proteasoma all'interno dei LB suggerisce che l' α -sinucleina è una disfunzione nel meccanismo di

degradazione da parte del proteasoma, siano coinvolti nell'insorgenza di questa malattia neurodegenerativa.

Il gene che codifica per l' α -sinucleina, contiene 7 esoni, 5 dei quali sono codificanti (Norris *et al.*, 2004). Nello stesso gene, si possono avere tre mutazioni missenso (A53T, A30P, E46K), oltre alla triplicazione del gene stesso, che portano alla forma autosomica dominante della MdP (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Krüger *et al.*, 1998).

Numerosi gruppi di ricerca hanno dimostrato che l' α -sinucleina, può aggregarsi per formare proto fibrille e strutture fibrillari amiloidi (Conway *et al.*, 1998; Giasson *et al.*, 1999). In particolare, le mutazioni A53T e A30P incrementano il tasso di oligomerizzazione dell' α -sinucleina e la formazione di foglietti β (Narhi *et al.*, 1999; Uversky e Fink, 2002). La sovraespressione di α -sinucleina *in vitro* induce la formazione di aggregati citoplasmatici (Stefanis *et al.*, 2001), mentre nei roditori provoca la formazione di inclusioni nella glia (Stefanova *et al.*, 2001). In particolare sono proprio gli aggregati di α -sinucleina, che come detto in precedenza, rappresentano l'elemento più importante dei LB (Hornykiewicz, 2001). Questo dato è stato rafforzato da esperimenti condotti su *Drosophila Melanogaster* dove la sovraespressione dell' α -sinucleina causa la formazione di inclusi molto simili ai LB e la perdita di neuroni (Feany e Bender, 2000). Inoltre, lo stesso studio ha permesso di confermare l'importanza del dominio idrofobico dell' α -sinucleina. Negli

esemplari di *Drosophila Melanogaster* che non esprimevano la porzione idrofobica dell' α -sinucleina non si osservavano né la formazione di aggregati né lo sviluppo una degenerazione (Feany e Bender, 2000).

3.1 Interazione tra l' α -sinucleina, il sistema ubiquitina proteasoma e l'autofagia

L'inibizione del proteasoma comporta la formazione di inclusioni immunoreattive per l' α -sinucleina nelle cellule PC12 (Rideout *et al.*, 2001) e in colture neuronali primarie del mesencefalo (McNaught *et al.*, 2002). Tuttavia, i livelli totali di α -sinucleina non sono alterati dall'inibizione del proteasoma nelle cellule PC12 o nei neuroni primari mesencefalici (Biasini *et al.*, 2004; Rideout *et al.*, 2001). Inoltre, la sovraespressione sia della forma normale di α -sinucleina, (Snyder *et al.*, 2003) che dell' α -sinucleina mutata (Stefanis *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2001), inibisce l'attività del proteasoma.

La poliubiquitinazione dell' α -sinucleina, requisito necessario per la degradazione da parte del proteasoma 26S, deve ancora essere accertata (Stefanis *et al.*, 2001). Non è chiaro se la poliubiquitinazione dell' α -sinucleina sia necessaria per la sua degradazione. L' α -sinucleina fosforilata diventa bersaglio della mono- o della di-ubiquitinazione in encefali affetti da

sinucleopatie (Hasegawa *et al.*, 2002). Tuttavia, non è noto se questa modificazione giochi un ruolo nella degradazione da parte del proteasoma, dal momento che la monoubiquitinazione proteica funziona soprattutto come segnale per l'endocitosi o per il traffico di membrana (Hicke, 2001). L'accumulo o l'aggregazione di α -sinucleina possono formare vari complessi interagendo con molte proteine e modulare varie funzioni cellulari, incluso la degradazione proteica da parte del proteasoma (Ghee *et al.*, 2000; Snyder *et al.*, 2003).

L'autofagia potrebbe essere un altro sistema in grado di degradare l' α -sinucleina. Infatti le proteine capaci di formare aggregati che presentano catene di polialanina e di poliglutammina sono degradate per via autofagica. Alla luce di queste osservazioni Webb e collaboratori nel 2003 hanno condotto una serie di esperimenti su cellule che esprimevano la forma wild type umana e cellule esprimenti la forma mutata di α -sinucleina in condizioni in cui l'autofagia era stimolata e bloccata (Webb *et al.*, 2003). I risultati ottenuti da questi autori dimostrano che l' α -sinucleina non soltanto viene degradata dal proteasoma, ma l'autofagia è in grado di rimuovere sia la forma wild-type che soprattutto la forma mutata che forma aggregati (Webb *et al.*, 2003). Inoltre la presenza di vacuoli autofagici che contengono l' α -sinucleina e l'aumento dei livelli intracellulari di questa proteina dopo l'inibizione dell'attività lisosomiale

confermano una degradazione per via autofagica (Webb *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004).

4 La Metanfetamina

La metanfetamina (MA) è una sostanza d'abuso che appartiene alla categoria degli psicostimolanti. Il termine "psicostimolante" si riferisce a sostanze che producono nell'uomo uno spettro di effetti che comprendono un elevato tono dell'umore, riduzione del sonno e della percezione della fatica (Rothman e Baumann, 2003). Negli ultimi anni la tossicodipendenza da MA ha suscitato un notevole interesse in rapporto alla notevole dipendenza e agli effetti neurotossici che questa sostanza provoca e anche in considerazione di un crescente aumento del suo consumo sia negli Stati Uniti che in Europa (Lukas, 1997). La relativa facilità di sintesi, che consiste nella riduzione del precursore chimico efedrina, unita alla facile reperibilità sul mercato di questa materia prima ha favorito la nascita di molti laboratori clandestini che ogni anno immettono nei circuiti dello spaccio quantità considerevoli di MA.

La MA fa parte di una famiglia di composti che presenta una struttura chimica comune caratterizzata dalla presenza di un anello β -feniletilaminico (Figura. 4.1.). Questa molecola agisce sul Sistema Nervoso Centrale (SNC) rilasciando neurotrasmettitori monoaminergici quali la dopamina, la noradrenalina e la serotonina (Kuczenski *et al.*,

1995; Sulzer *et al.*, 2005). A differenza della cocaina, che aumenta la disponibilità di dopamina (DA) inibendo il processo di ricapatazione sinaptico, la MA induce una maggiore disponibilità di questo neurotrasmettitore attraverso molteplici meccanismi. In primo luogo, oltre ad interrompere la ricapatazione attraverso l'inibizione del trasportatore dopaminergico (DAT), la MA favorisce la liberazione della dopamina contenuta nelle vescicole del citosol (Brown *et al.*, 2001). A causa dell'alta concentrazione di DA citosolica il DAT inverte la direzione del trasporto provocando un massiccio rilascio di DA dal terminale dopaminergico nel vallo sinaptico (Fleckenstein *et al.*, 1997). Inoltre la MA stimola l'attività della tirosina idrossilasi (TH) l'enzima che catalizza la formazione della DA (Mandell e Morgan, 1970). Infine, la MA inibisce le monoamminoossidasi, gli enzimi deputati alla degradazione della DA, aumentando la concentrazione di DA nel citosol (Mantle *et al.*, 1976).

La sinergia tra questi diversi meccanismi d'azione, fanno della MA un potente psicostimolante che si caratterizza inoltre per avere un tempo di emivita superiore a quello di molte altre sostanze d'abuso, come ad esempio la cocaina (8-13 ore per la MA contro le 1-3 ore per la cocaina). Per questo motivo, la durata degli effetti psicologici e comportamentali di questa molecola, sono sensibilmente superiori a quelli di molte altre sostanze psicostimolanti.

Gli effetti in acuto della MA consistono in uno stato di euforia ed un senso di benessere oltre ad un incremento della libido ed una diminuzione dell'appetito. D'altra parte la MA provoca anche effetti negativi a livello periferico (aumento della pressione sanguigna, ipertermia e tremore muscolare) e centrale (ansia, insonnia aggressività, paranoia e allucinazioni) (Nordahl *et al.*, 2003).

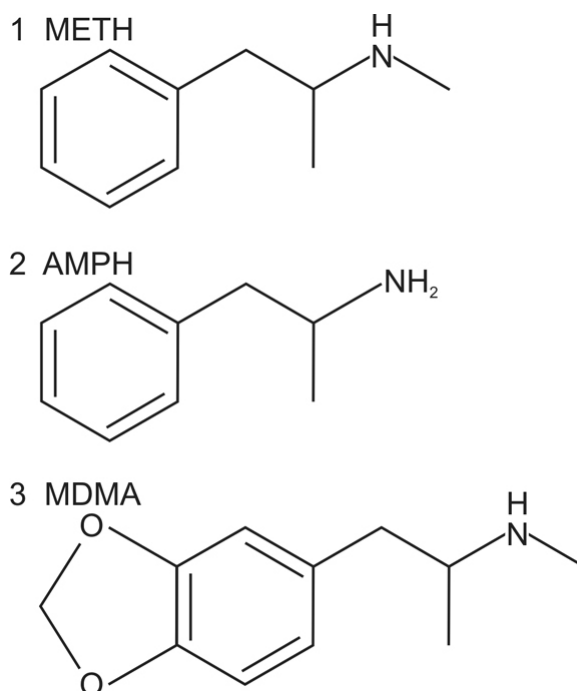


Figura 4.1. Struttura chimica della MA (1) a confronto con quelle di anfetamina (2) e MDMA, “Ecstasy” (3).

4.1 Alterazioni indotte dall'assunzione della Metanfetamina nell'uomo

La MA induce una riduzione delle capacità motorie, di apprendimento e di linguaggio, creando gravi danni e squilibri nell'organismo (Volkow et al., 2001). viene sintetizzata clandestinamente in laboratori improvvisati. La MA viene commercializzata illegalmente in Europa, Stati Uniti, così come in tutto il mondo. La MA è conosciuta anche in gergo popolare come "ICE" (ghiaccio) questo nome è attribuito al fatto che la MA viene smerciata sotto forma di cristalli che sembrano proprio fatti di ghiaccio (crystal meth).

Il fatto che l'MA venga preparata in laboratori segreti e in ambiente casalingo, comporta che l' MA non venga assunta pura ma tagliata con sostanze che possono essere molto dannose per la salute dell'uomo. Infatti può essere tagliata con acetato di piombo con il metodo di amalgama. Nel 1987 sono stati descritti due casi di avvelenamento acuto proprio da piombo (Allcot et.al, 1987). I pazienti presentavano sintomi quali dolore addominale, nausea, vomito, dolorabilità corporea, debolezza, perdita di peso, anoressia e ferite.

Dalle analisi della MA usata fu rilevata la presenza di piombo pari al 60% del peso corporeo (Ballard et.al, 1985; Ruttenber et.al, 1986).

Recenti studi hanno dimostrato che l'MA presa cronicamente in dosi elevate, crea danni strutturali e funzionali, con cambiamenti nelle aree encefaliche che controllano la memoria e le emozioni (London et.al, 2004; Thompson et.al, 2004).

L'abuso di metanfetamina può portare l'organismo ad una elevata dipendenza, quest'ultima, viene caratterizzata da disturbi ossessivo compulsivi, come per esempio ripetizione di gesti e atteggiamenti, tic, spasmi motori, distonie. L'insorgenza di tutti questi sintomi si ha con l'abuso prolungato di MA, più l'organismo viene esposto alla somministrazione di questa sostanza, più col tempo quello che poteva essere un tic o un disturbo ossessivo, può sfociare in una vera e propria patologia. Questi sintomi possono rimanere anche durante e dopo il periodo di disintossicazione, e possono durare per lunghi periodi di astinenza come per anni o tutta la vita (Wang GJ, et.al, 2004).

Inoltre, gli abusatori cronici di MA possono presentare lesioni molto gravi e profonde a livello cutaneo, infatti la MA dà sensazioni cutanee come prurito o per esempio la sensazione di avere tanti insetti che camminano sulla pelle; così si arriva a casi limite in cui gli abusatori arrivano a mordersi la cute, si toccano e grattano il viso e il corpo percependo questo fastidio fino a che nel tempo la stessa pelle si deteriora e si riempie di ferite, fino a poterle notare ad occhio nudo. Questo atteggiamento lesivo nei confronti della propria persona è stato anche dimostrato in modelli animali trattati con MA.

Un altro aspetto importante di abuso di metanfetamina è la trasmissione di malattie come HIV e le patite B e C. Gli effetti neurotossici della sostanza, la disinibizione, l'aumento della libido e la mancanza di giudizio, possono spingere a rapporti sessuali non protetti. L'AIDS può anche essere trasmesso tramite l'uso di siringhe utilizzate da più persone, nel caso che la sostanza venga iniettata. Inoltre gli individui HIV- positivi che abusano di MA, presentano un maggior danno neuronale e deficit cognitivi rispetto a persone contagiate dal virus che non fanno uso di droghe (Chang L, et.al, 2005; Rippeth JD et.al, 2004).

Inoltre l'uso prolungato di MA induce anche dei profondi cambiamenti nell'aspetto delle persone che ne abusano. Tuttavia per gli stessi abusatori, a volte, è difficile vedere i cambiamenti su se stessi. L'unica cosa a cui pensano è di poter riprovare quelle sensazioni e quelli stimoli che la MA induce e per questo sono ciechi ai cambiamenti che il loro corpo subisce. Chiunque altro può vedere i danni e i cambiamenti del loro corpo fuorché il vero abusatore. La MA deteriora il viso e il corpo in vari modi distinti e ben visibili, questi sintomi sono così riconoscibili che diventa abbastanza facile individuare un abusatore di MA. E'importante ricordare, però, che non tutti sono allo stesso livello o stadio della dipendenza. Sicuramente quegli individui che mostrano gravi lacerazioni, segni, ferite, piaghe ed acne, si trovano ad uno stadio già abbastanza avanzato.

4.2 Induzione della malattia di Parkinson dato dall'abuso di metanfetamina.

Gli abusatori di MA hanno una possibilità maggiore di sviluppare la Malattia di Parkinson (Callaghan et al. 2012.). Nonostante la conoscenza dei meccanismi di azione neuropatologici, la patologia cellulare che collega il meccanismo di azione tossico con le alterazioni anatomiche rimangono sconosciute.

Una diminuzione dei trasportatori dei neurotrasmettitori a volte si ripercuote in perdita delle corrispondenti fibre nervose (in questo caso dopaminergiche), poiché i trasportatori sono localizzati sulla membrana di queste fibre. E' da notare, per esempio, la grande riduzione del DAT nello striato dei pazienti affetti dalla malattia del Parkinson, dove, come si sa, l'innervazione dopaminergica dello striato è gravemente compromessa.

A questo punto, non possiamo dire con certezza se la ridotta densità del DAT nei consumatori di metanfetamina sia un segno di neurotossicità a carico della DA, sebbene tale interpretazione sia concorde in studi negli animali.

Inoltre, dal momento che sembra esserci una progressiva perdita di neuroni e fibre dopaminergiche durante il normale invecchiamento nell'uomo, anche un danno quantitativamente modesto a questo sistema in una fase

precedente della vita potrebbe in seguito predisporre allo sviluppo della malattia di Parkinson.

4.3 Neuropatologia della metanfetamina nell'uomo e in modelli animali

La MA è tossica per i terminali dopaminergici nigrostriatali sia nei modelli animali che negli uomini. Nei topi iniezioni ripetute di MA inducono una degenerazione massiva del sistema nigro-striatale, che si riflette nel dimezzamento dei livelli di DA striatale e di acido 3,4 di-idrossi-fenil-acetico (DOPAC), nonché in una sostanziale riduzione della tirosina idrossilasi e del trasportatore della DA nello striato (Fornai *et al.*, 2004). La degenerazione del sistema nigro-striatale indotto dalla MA risulta ampiamente ridotto nei topi ai quali mancano i recettori adrenergici $\alpha 1b$. Negli stessi animali sempre in in striato, si osserva anche la riduzione della quantità di DA rilasciata dopo somministrazione di MA che si riflette in una ridotta attività locomotoria paragonata a quella dei topi *wild type* (Fornai *et al.*, 2004).

Nei topi la somministrazione di MA (5 mg/kg X 3 i.p., con un intervallo di 2 ore) causa la comparsa di inclusioni intracellulari nel nucleo dei neuroni striatali e nel citoplasma dei neuroni della substantia nigra pars compacta (Fornai *et al.*, 2004), che si marcano specificamente per l' α -sinucleina e

l'ubiquitina. Pertanto, la MA può essere utilizzata come modello sperimentale per lo studio della MdP, in quanto, negli animali da esperimento, è in grado di determinare lesioni a livello dei terminali dopaminergici nigrostriatali, riproducendo così molte caratteristiche cliniche osservate nei pazienti affetti da MdP.

Inoltre, è stato dimostrato che anche gli abusatori di MA presentano inclusi nei neuroni dopaminergici della substantia nigra (Quan *et al.*, 2005).

Gli effetti neurotossici della MA sono riconducibili al fatto che questa tossina agisce selettivamente sul terminale dopaminergico striatale determinando un massiccio rilascio di DA, che si ridistribuisce dalle vescicole al citosol e da qui allo spazio extracellulare (Sulzer e Rayport, 1990). Questo effetto spiega il rapido depauperamento delle riserve intraneuronali di DA, che induce la degenerazione del sistema nigrostriatale caratteristica della MdP (Ricaurte *et al.*, 1982; Seiden *et al.* 1987).

4.4 Tossicità della metanfetamina

Da tempo si conoscono gli effetti tossici della MA. Questi effetti sono legati principalmente alla formazione di radicali liberi dovuti a processi di auto-ossidazione della DA ed al conseguente aumento dello stress ossidativi.

La DA infatti, svolge un ruolo fondamentale nella tossicità neuronale indotta dalla MA. Il primo meccanismo postulato di neurotossicità DA-mediata prevedeva che gli elevati livelli di DA extracellulari, prodotti dal trattamento anfetaminico, innescassero processi di auto-ossidazione della DA, con conseguente produzione di specie molecolari altamente reattive e stress ossidativo (Seiden e Vosmer, 1984; Axt *et al.*, 1990).

Ben presto fu però chiaro che lo stress ossidativo DA-dipendente doveva avere inizio già all'interno del terminale dopaminergico, dove l'equilibrio nella distribuzione intracellulare del pool di molecole di DA viene profondamente alterato dalle anfetamine (Cubells *et al.* 1994). In particolare, una volta entrate nel terminale dopaminergico sfruttando il trasportatore di membrana, le molecole anfetaminiche, parzialmente lipofile, sono in grado di penetrare all'interno di lisosomi, endosomi e vescicole sinaptiche, causando "swelling" osmotico, formazione di vacuoli e rilascio intracitosolico di DA (Sulzer e Holtzman, 1989). All'interno del citoplasma, la DA, non più degradabile dalle MAO, anch'esse bloccate dalle anfetamine, può subire auto-ossidazione e portare ad una notevole produzione di H₂O₂, anione superossido, ione idrossido e chinoni tossici (Imam *et al.*, 2001).

La presenza di elevate concentrazioni di specie altamente reattive e radicali liberi all'interno del terminale assonico può alterare il funzionamento dei mitocondri e interferire con la produzione di energia metabolica (Riddle *et*

al., 2006) e causare morte cellulare (Boveris *et al.*, 2000). D'altra parte i mitocondri potrebbero rappresentare potenziali bersagli subcellulari diretti della MA. Infatti, sembra che la morte per apoptosi di cellule in coltura indotta da MA, possa dipendere da un'interferenza diretta della MA con le funzioni mitocondriali e successiva attivazione della via delle caspasi (Lemasters *et al.*, 1999).

Pertanto, lo stress ossidativo sembra essere il meccanismo finale con cui la MA provoca neurotossicità.

Recentemente è stato ipotizzato che si possano formare prodotti altamente tossici tra DA-chinoni e α -sinucleina e che questo possa essere un evento biochimico critico proprio nella MdP (Conway *et al.*, 2001; Sulzer, 2001).

I neuroni dopaminergici sono particolarmente vulnerabili alla MA in quanto contengono alti livelli di DA citosolica, risultando quindi un sistema in cui l'equilibrio metabolico può facilmente essere alterato. Pertanto, un massivo rilascio di DA all'interno della cellula dopaminergica potrebbe provocare un aumento dei DA-chinoni e relative specie ossidanti le quali, a loro volta, altererebbero la struttura di proteine, come l' α -sinucleina, che poi devono essere degradate dai sistemi di detossificazione. L'eccesso di proteine alterate potenzialmente tossiche per la cellula, che in condizioni di stress ossidativo si accumulano in grande quantità all'interno della cellula, può alterare la

funzionalità dei sistemi di detossificazione che non sono più in grado di operare la degradazione proteica e indurre neurodegenerazione (Figura 4.2) (Iacovelli *et al.*, 2006; Ferrucci *et al.*, 2008a-b).

5 Scopo dello studio

Lo scopo di questo studio è stato quello di indagare da un punto di vista ultrastrutturale il ruolo dell'autofagia nella tossicità da MA, in modo da comprendere se essa svolga una funzione protettiva o contribuisca alla morte cellulare. lo scopo di questo studio è stato quello di indagare da un punto di vista ultrastrutturale il ruolo dell'autofagia nella tossicità da MA, in modo da comprendere se essa svolga una funzione protettiva o contribuisca alla morte cellulare. In particolare, in un sistema *in vitro* sono stati indagati dopo trattamento con MA i vari compartimenti sub cellulari sia in modo qualitativo che quantitativo :

- 1) i cambiamenti ultrastrutturali tempo-dipendenti
- 2) i vacuoli autofagici;
- 3) la variazione di proteine specifiche come l' α -sinucleina
- 4) l'alterazione mitocondriale;
- 5) la morte cellulare con particolare attenzione all'apoptosi

6 MATERIALI E METODI

6.1 Colture cellulari

La linea cellulare PC12 derivante da feocromocitoma di ratto è stata ottenuta dall'American Type Culture Collection (ATCC).

Le cellule sono state coltivate nel mezzo di coltura RPMI 1640 supplementato con 10% di horse serum (HS) inattivato al calore, 5% di siero fetale bovino (FBS), penicillina (50 IU/ml) e streptomicina (50 mg/ml). Le cellule sono state coltivate in fiasche per colture cellulari da 75 cm² e mantenute a 37°C in un incubatore umidificato contenente il 5% di CO₂.

Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni 3 giorni e le cellule sono state mantenute nelle condizioni sopra descritte fino al momento del loro impiego.

Le cellule sono state utilizzate per gli esperimenti quando si trovavano in fase di crescita logaritmica.

Box 1

Le cellule PC12

Le cellule PC12 costituiscono una linea cellulare comunemente usata come modello attraverso il quale studiare i meccanismi biochimici che sono alla base sia della fisiologia che della degenerazione dei neuroni catecolaminergici (Tischler, 2002). Infatti le PC12 presentano molte strutture proprie dei neuroni dopaminergici. In particolare contengono l'intero apparato di sintesi per la produzione delle catecolamine endogene, soprattutto dopamina (Vaccaro et al 1980) e i recettori (*dopamine transporter*, DAT) per la ricaptazione di questo neurotrasmettitore (Sampath *et al.*, 1994). Inoltre presentano la iso-forma di tipo A delle monoaminaossidasi (MAO A) che caratterizza proprio i neuroni dopaminergici. (Youdim, 1991). Pertanto, proprio sulla base di questi meccanismi fisiologici, le colture di cellule PC12 rappresentano un modello che consente di poter indagare anche gli effetti neurotossici di sostanze che agiscono direttamente sui neuroni dopaminergici centrali, con significative implicazioni per lo studio di malattie neurodegenerative che colpiscono proprio i neuroni dopaminergici, come ad esempio la MdP. In tal modo è possibile valutare in questo sistema, semplice e riproducibile, sia le prime alterazioni molecolari che tutto il processo dinamico degenerativo indotto da neurotossine, come la MA.

6.2 Trattamenti farmacologici

Per la valutazione dose-risposta le cellule sono state trattate con dosi crescenti di MA (0,001-1 μ M), mentre il tempo d'esposizione veniva mantenuto costante a 24 ore.

Per lo studio tempo-dipendenza le cellule sono state esposte ad una dose fissa di MA (1 μ M), per diversi intervalli di tempo (4, 12, 24, 72 e 168 ore). Alla fine dei trattamenti, le cellule PC12 sono state raccolte, centrifugate a 1000 g per 5 minuti e processate per la microscopia elettronica.

Per lo studio sulle frazioni cellulari le PC12 sono state trattate con una dose di MA pari a 1 μ M con un tempo di esposizione di 72 ore in modo da ottenere il maggior numero di inclusi citoplasmatici per cellula e un numero ridotto di morte cellulare.

6.3 Microscopia elettronica

6.3.1 Microscopia elettronica a trasmissione

Le colture cellulari sono state centrifugate a 1000 rpm per 5 minuti, fissate in tampone fosfato 1 M contenente 2% di paraformaldeide e 0,1% di

glutaraldeide per 1 ora e 30 minuti, queste due aldeidi permettono la fissazione della componente proteica.

Dopo lavaggi nello stesso tampone è stata effettuata una post fissazione con OsO_4 1% (Electron Microscope Sciences, Hatfield, PA, USA) in tampone fosfato per 1 ora e 30 minuti a 4°C. Il tetrossido di osmio è in grado di fissare la componente lipidica, quindi soprattutto le membrane cellulari. È un fissativo largamente utilizzato in microscopia elettronica poiché si adatta bene all'esigenza di preservare i dettagli ultrastrutturali, limitando eventuali modificazioni introdotte durante le successive fasi di disidratazione e inclusione.

Successivamente sono state effettuate una serie di disidratazioni con alcool etilico a concentrazioni crescenti, in seguito i campioni sono stati mantenuti per 15 minuti in ossido di propilene, overnight in una miscela di ossido di propilene e resina epossidica in proporzione 1:1, infine inclusi in Epon-Araldite (Fluka-Sigma, Svizzera). La polimerizzazione della resina è stata effettuata trasferendo i campioni in stufa (60°C) per 3 giorni.

Successivamente i campioni cellulari per la microscopia elettronica sono stati piramidati e con l'ausilio di un ultramicrotomo a lame di diamante, sono state ottenute sezioni ultrafini (circa 40 nm di spessore), che sono state raccolte su retini di nichel. Le sezioni sono state poi contrastate con acetato di uranile e

citrato di piombo e infine esaminate al microscopio elettronico a trasmissione Jeol Jem 100SX (Jeol, Tokyo, Giappone).

6.3.2 Immunolettromicroscopia - Tecniche di post-inclusione

Per le indagini immunocitochimiche i *pellet* cellulari sono stati processati come descritto precedentemente per la microscopia elettronica a trasmissione (TEM), eccetto che per la contrastazione che è stata effettuata dopo l'immunomarcatura.

Sezioni ultrafini di campione sono state raccolte su retini di nichel e trattate come segue:

- 1) etching in sodio metaperiodato (NaIO_4 soluzione satura in acqua distillata) a temperatura ambiente per 30 minuti in camera umida
- 2) 3 lavaggi in PBS ciascuno di 10 minuti
- 3) blocco dei siti antigenici aspecifici con soluzione di goat-serum al 10% e saponina allo 0,2% in PBS per 20 minuti
- 4) incubazione con anticorpo primario in soluzione contenente goat-serum 1%, saponina allo 0,2% in PBS *overnight* a 4 °C in camera umida
- 5) 3 lavaggi in PBS ciascuno di 10 minuti

- 6) Incubazione con anticorpo secondario coniugato a particelle d'oro (diametro 10-20 nm), in una soluzione contenente goat-serum all' 1%, saponina allo 0,2% in PBS per 1 ora a temperatura ambiente.
- 7) 3 lavaggi in PBS ciascuno di 10 minuti
- 8) fissazione con glutaraldeide all'1% in PBS per 3 minuti
- 9) lavaggio in acqua distillata per 5 minuti
- 10) contrastazione con acetato di uranile e citrato di piombo

Gli anticorpi utilizzati sono stati: anti- α -sinucleina (fornito da Dr. Thomas C Sudhof), anti-ubiquitina (Sigma-Aldrich, St Louis, Mi, USA) e anti-proteasoma 20S (Calbiochem, San Diego, CA, USA), anti PA 700 (Calbiochem), anti Rab-24 (BD biosciences, St Jose, CA, USA), anti beclin (Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) antiLC3 (Santa Cruz); gli anticorpi primari sono stati diluiti 1:10 mentre gli anticorpi secondari sono stati diluiti 1:20.

Per la doppia marcatura le sezioni sono state incubate contemporaneamente con i due anticorpi primari scelti e successivamente con anticorpi secondari specifici che differivano per il diametro delle particelle d'oro a cui erano legati; nello specifico 10 nm e 20 nm.

6.1 Inibizione dell'autofagia

La funzione dell'autofagia nella tossicità indotta dalla MA nella linea cellulare PC12 è stato valutato utilizzando due inibitori del processo autofagico: la 3metiladenina (3MA) (Sigma). La 3MA riduce la formazione di autofagosomi visibili al microscopio elettronico inibendo la proteina PI3k (Blommaert *et al.*, 1997).

Inibizione con 3MA: Le cellule PC12 sono state seminate in piastre sterili alla densità di 1×10^6 cellule per pozzetto 24 ore prima del trattamento. Quindi le cellule sono state trattate con 3MA 10 mM 2 ore prima dell'esposizione alla MA $1 \mu\text{M}$ per vari tempi (12, 24 ore). La soluzione finale è stata ottenuta per diluizione da una soluzione madre pari a 100 mM ottenuta solubilizzando la 3MA in dimetil solfossido (DMSO) (Sigma, USA) e portando a volume con il mezzo di coltura.

Alla fine dei trattamenti le cellule sono state raccolte e processate per la microscopia elettronica.

6.2 Microscopia ottica a fluorescenza

Per l'analisi al microscopio ottico a fluorescenza le cellule sono state fatte aderire su un vetrino portaoggetto posto nella piastra di coltura. Le cellule sono state trattate con 3MA (10 mM) 2 ore prima dell'esposizione per 12 ore a MA 1 μ M.

Quindi i campioni sono stati incubati con una soluzione di siero bloccante (normal donkey serum 5%, Triton X-100 0,3%, tampone fosfato), per 1 ora a temperatura ambiente, e successivamente con anticorpi primari diretti contro α -sinucleina e catepsina D (marcatore lisosomiale) (Sigma). Tutti gli anticorpi primari sono stati diluiti in una soluzione contenente tampone fosfato e TritonX-100 ed incubati overnight a 4°C.

Successivamente, i campioni sono stati incubati per 2 ore a temperatura ambiente con gli anticorpi secondari (Jackson ImmunoResearch Laboratories) coniugati a Cy3 (colore rosso) e Cy2 (colore verde). Tutti gli anticorpi secondari sono stati usati alla diluizione di 1:100.

Misurazione dell'integrità della membrana mitocondriale

L'integrità della membrana mitocondriale è stata misurata usando la colorazione con il Mitotracker Red (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). Cellule PC12 cresciute su vetrini sono state incubate con 0,2 μ l/ml di una

soluzione di Mitotracker per 15 min a 37°C, fissate in paraformaldeide al 3,7% per 30 min e permeabilizzate con una soluzione di TritonX-100 allo 0,2% per 20 min. Successivamente queste stesse cellule, sono state processate per l'immunofluorescenza con l'anticorpo anti-bax.

I campioni processati per l'immunofluorescenza sono stati osservati al microscopio confocale a scansione laser (CLSM, Zeiss) utilizzando il programma di analisi dell'immagine del CLSM (LSM software 2.3, Zeiss).

6.3 Purificazione degli inclusi citoplasmatici

6.3.1 Centrifugazione differenziale

Con questa metodica il materiale cellulare viene separato in frazioni per centrifugazioni successive, aumentando ad ogni passaggio il valore di campo centrifugo applicato.

In particolare, cellule PC12 trattate con MA 1 μ M per 72 ore d'esposizione sono state private del mezzo di coltura dopo blanda centrifugazione.

Una parte del *pellet* ottenuto è stato prelevato e processato per la microscopia elettronica, la restante parte è stata risospesa in tampone (saccarosio 0,25 M, EDTA 3mM a pH 7.4 in H₂O) e processata per ottenere frazioni cellulari

purificate. Inizialmente è stata effettuata la lisi delle cellule prima con metodi fisici, mediante shock termico con 10 cicli di congelamento e scongelamento e poi con metodi meccanici, mediante l'utilizzo del *dounce*. Quindi il campione è stato sottoposto a centrifugazioni (200g-20000g, 10 minuti-1 ora), il pellet prelevato e il sovranatante di volta in volta recuperato e sottoposto alla centrifugazione successiva. Alla fine sono state ottenute 4 frazioni cellulari contenenti differenti elementi citoplasmatici. Ogni frazione così ottenuta è stata processata per l'analisi ultrastrutturale mediante TEM.

6.3.2 Parametri morfologici per la valutazione degli stadi maturativi degli inclusi citoplasmatici

Gli inclusi sono stati suddivisi in tre gruppi ognuno corrispondente a uno stadio maturativo differente. I parametri morfologici sono stati definiti in riferimento al lavoro di Gomez-Tortosa e collaboratori del 2000 (Gomez-Tortosa *et al.*, 2000) effettuato sui LB. In particolare, lo stadio maturativo precoce (stadio 1) si riferisce a inclusi che presentano una struttura multilamellare. Gli inclusi che sono costituiti da un *core* elettron denso ancora avvolto da membrane appartengono a uno stadio maturativo intermedio (stadio 2), infine lo stadio 3, in cui le membrane non sono più evidenti si riferisce a uno stadio maturativo più avanzato.

6.4 Conta degli inclusi citoplasmatici

La quantità degli inclusi citoplasmatici nelle cellule PC12 e il numero di cellule con inclusi è stata misurata contando su microfotografie a 4000 ingrandimenti per un totale di 1000 cellule. Il numero di cellule che presentavano inclusi citoplasmatici è stato espresso come percentuale delle cellule con inclusi rispetto al numero totale di cellule presenti.

La quantità degli inclusi citoplasmatici presenti nelle frazioni cellulari è stato espresso valutandone la densità su una superficie di $1 \mu\text{m}^2$.

6.5 Valutazione numerica e morfologica dei mitocondri, e delle cellule apoptotiche

Nelle nostre impostazioni sperimentali abbiamo utilizzato pellet cellulari poiché le sezioni ultrafini contengono cellule orientate casualmente, costituendo una condizione appropriata per il calcolo quantitativo (Yla-Anttila *et al.*, 2009). Per l'analisi morfometrica ultrastrutturale, i pellet cellulari sono stati esaminati direttamente con il microscopio elettronico a trasmissione ad un ingrandimento di 6000X in cieco, da due osservatori indipendenti, al fine di distinguere strutture subcellulari, quali mitocondri e la presenza di segni caratteristici dell'apoptosi (marginalizzazione e condensazione della cromatina,

corpi apoptotici). Ogni retino conteneva sezioni non consecutive e per ognuno di essi abbiamo osservato una media di circa 50 cellule. Abbiamo analizzato un numero tale di retini al fine di ottenere una quantità totale di 1000 cellule per ogni gruppo sperimentale. Con la semplice microscopia abbiamo contato: (i) il numero totale di mitocondri per cellula; (ii) il numero di mitocondri alterati; (iii) e le cellule apoptotiche. Al fine del riconoscimento di un mitocondrio alterato, abbiamo considerato i seguenti parametri: 1. La diluizione della matrice che si estende da una piccola area mitocondriale fino all'intera area mitocondriale; 2. La presenza di criste mitocondriali disordinate e/o frammentate. La percentuale di mitocondri alterati è stata determinata contando il numero di organelli anormali (in accordo con i parametri descritti sopra) sul numero totale di mitocondri (Fornai *et al.*, 2008). La conta del numero di cellule apoptotiche nei differenti gruppi è stata effettuata valutando 20 retini (circa 50 cellule per retino).

6.6 Analisi statistica

I dati ottenuti dalle analisi morfologiche e biochimiche sono espressi come media di tre triplicati. I dati sono stati analizzati usando il test ANOVA seguito dall'analisi di Sheffe. L'ipotesi nulla (H_0) è stata rifiutata per $p < 0,05$.

7 RISULTATI

7.1 Ruolo della metanfetamina nell'insorgenza di inclusioni citoplasmatiche

L'esposizione delle cellule PC12 a dosi crescenti di MA e a tempi diversi determina la comparsa di inclusioni citoplasmatiche. In particolare, la modalità dell'insorgenza di queste strutture risulta dose e tempo dipendente. La curva dose-risposta mostra che all'aumentare della concentrazione di MA, dopo 24 ore, aumenta il numero di inclusioni per cellula (Figura 7.1), raggiungendo il massimo valore a 1 μ M ($4,38 \pm 0,48$).

Alla dose di 1 μ M di MA, già dopo 12 ore d'esposizione inclusioni citoplasmatiche sono presenti nell'intera popolazione cellulare ($98\% \pm 2$) (Figura 7.2). Il loro numero per cellula aumenta con l'aumentare del tempo d'esposizione raggiungendo un plateau a 72 ore. A tempi precoci (4 ore) gli inclusi sono rari nel citoplasma ($3,5 \pm 0,1$), (Figura 7.3 a-b), mentre a 72 ore si ottiene il maggior numero di inclusi per singola cellula, che infatti riempiono quasi interamente il citoplasma cellulare ($14,65 \pm 0,55$) (Figura 7.3 a-c).

In nessuna serie di esperimenti, né alla dose più alta (1 μ M) né per il tempo d'esposizione maggiore (168 ore), sono state individuate cellule apoptotiche in maniera significativa rispetto al controllo.

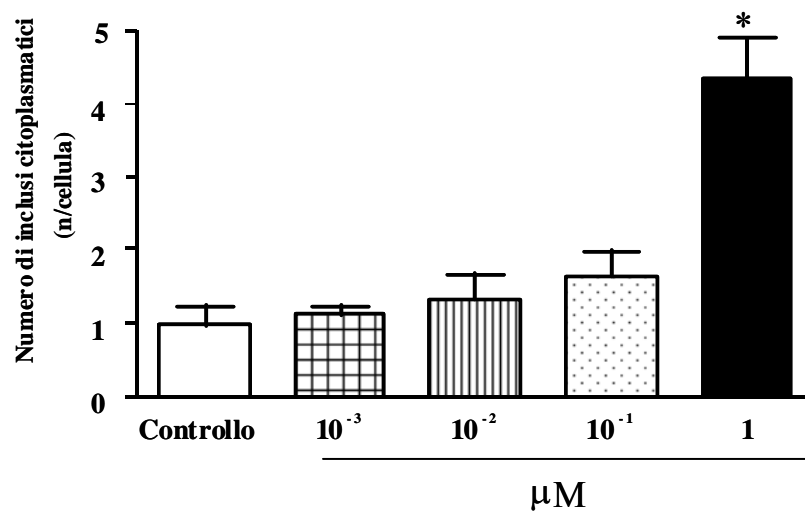


Figura 7.1. Numero di inclusi citoplasmatici per cellula in funzione di dosi crescenti di MA per 24 ore d'esposizione. *p<0,05 verso il controllo, 10⁻³, 10⁻², 10⁻¹ μM.

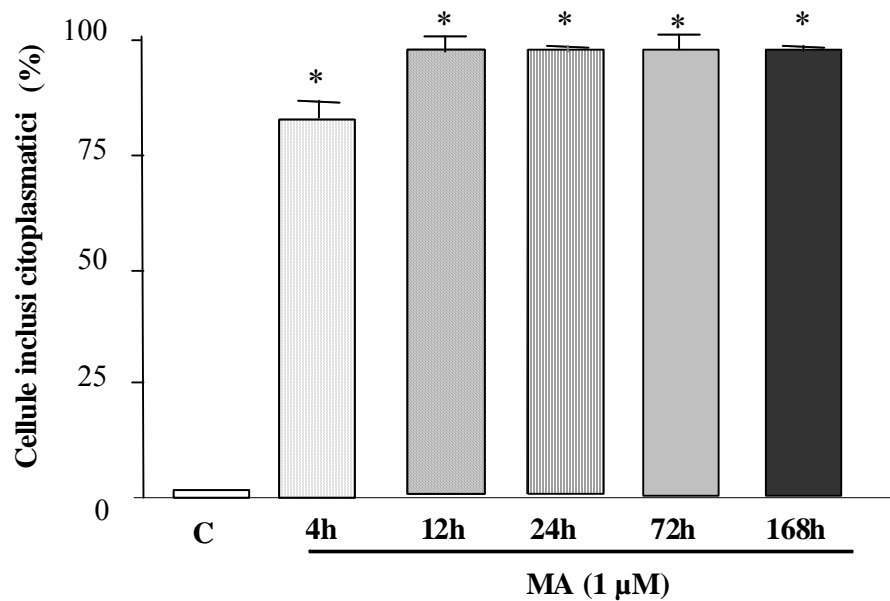


Figura 7.2. Percentuale di cellule PC12 con inclusi dopo esposizione a MA 1μM.

*p<0,05 vs i controlli corrispondenti.

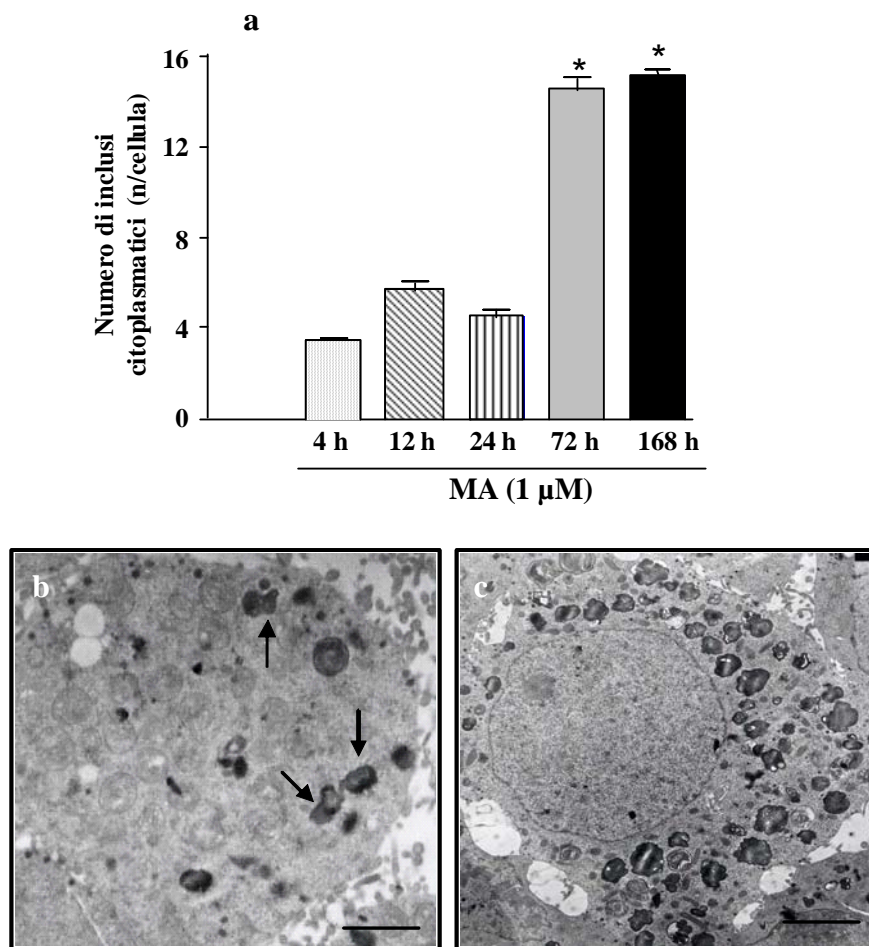


Figura 7.3. a) Numero di inclusi citoplasmatici per cellula in funzione del tempo alla dose di MA 1 μ M. * $p < 0,05$ vs 4, 12, 24 h. b) Sezione trasversale di una cellula PC12 dopo 4 ore d'esposizione con MA 1 μ M che mostra rare inclusioni citoplasmatiche (freccette). c) Sezione trasversale di una cellula PC12 dopo 72 ore d'esposizione alla dose di MA 1 μ M. Il citoplasma risulta completamente riempito dagli inclusi particolarmente elettrondensi. La barra corrisponde a: b) 1,4 μ m; c) 2,3 μ m.

7.1.1 Valutazione morfologica degli inclusi citoplasmatici

La valutazione ultrastrutturale ha messo in evidenza la varietà morfologica di queste strutture cellulari nei diversi tempi di esposizione mostrando un'evoluzione strutturale in funzione del tempo.

La maturazione delle inclusioni è risultata tempo-dipendente mostrando una progressiva fusione delle membrane esterne e lo sviluppo di un *core* elettrondenso simile a quello dei modelli *in vivo* (Figura 7.4) (Fornai *et al.*, 2004); la presenza di inclusioni con tali caratteristiche è prevalente a 168 ore, mentre a 72 ore si osserva la coesistenza dei diversi stadi maturativi.

Molti lavori dimostrano che la MA porta alla formazione di specie reattive dell'ossigeno che sono in grado di legarsi alle fibrille di α -sinucleina alterandone la conformazione e promuovendone l'aggregazione (Cadet *et al.*, 1995; Conway *et al.*, 2000; Norris *et al.*, 2005). Questi aggregati tossici per la cellula devono essere necessariamente rimossi dai sistemi di detossificazione cellulari, il sistema UP e/o il sistema autofagico. Pertanto abbiamo voluto verificare se vi fosse una collaborazione tra questi due sistemi. Inoltre, poiché i vacuoli autofagici che si evidenziano dopo esposizione a MA, potrebbero rimuovere organelli danneggiati (i mitocondri) e proteine *misfolded*, abbiamo verificato se nelle nostre condizioni sperimentali si formano aggregati di α -sinucleina e se questi colocalizzano in vacuoli citoplasmatici positivi per le

proteine marcatori dell'autofagia e del sistema UP. E' stato osservato che il trattamento delle cellule PC12 con MA induce la traslocazione dell' α -sinucleina all'interno di autofagolisosomi, individuati per mezzo dell'immunomarcatura per una proteina lisosomiale, la catepsina D. Infatti, come mostrato in figura (Fig. 7.5), dopo esposizione a MA gli aggregati di α -sinucleina colocalizzano con la catepsina D. In presenza di 3MA (inibitore dell'autofagia) questa colocalizzazione è ridotta e l'immunomarcatura per l' α -sinucleina è visibile isolatamente nel citoplasma, sottoforma di intensi aggregati (Figura 7.5). Pertanto questo dimostra che nelle cellule esposte a MA l'induzione della via autofagica promuove la rimozione degli aggregati di α -sinucleina. L'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione dopo immunocitochimica mostra che le inclusioni citoplasmatiche sono positive per l' α -sinucleina e per componenti appartenenti al sistema ubiquitina proteasoma (PA700, e la subunità 20S), nonché per marcatori del sistema autofagico come LC3, beclin1 e rab24 (Figura 7.6 a-b). Inoltre in alcune inclusioni è possibile osservare la presenza di mitocondri. Questi dati suggeriscono che il sistema autofagico e il sistema UP collaborano nella formazione delle inclusioni citoplasmatiche indotte da MA.

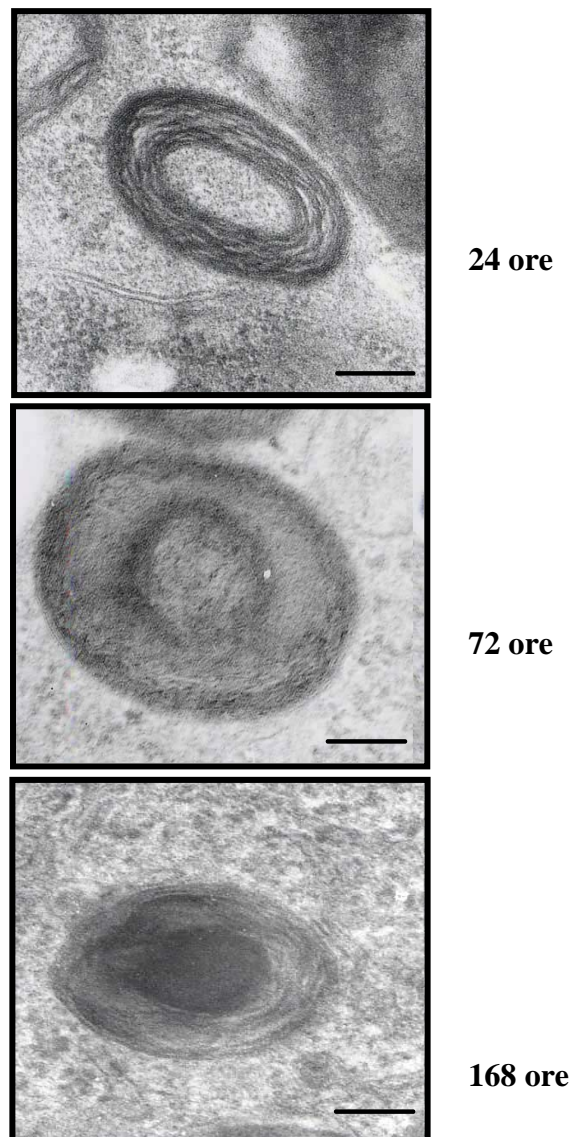


Figura. 7.4. Immagine di microscopia elettronica a trasmissione degli inclusi citoplasmatici indotti da MA alla dose di $1\mu\text{M}$ a tempi di esposizione diversi. Notare che a tempi precoci si osservano strati multilamellari concentrici (a), con l'avanzare del tempo si ha la progressiva fusione degli strati e la formazione di un *core* elettrondenso (b,c). La barra corrisponde a $0,35\ \mu\text{m}$, $0,23\ \mu\text{m}$, $0,35\ \mu\text{m}$ rispettivamente.

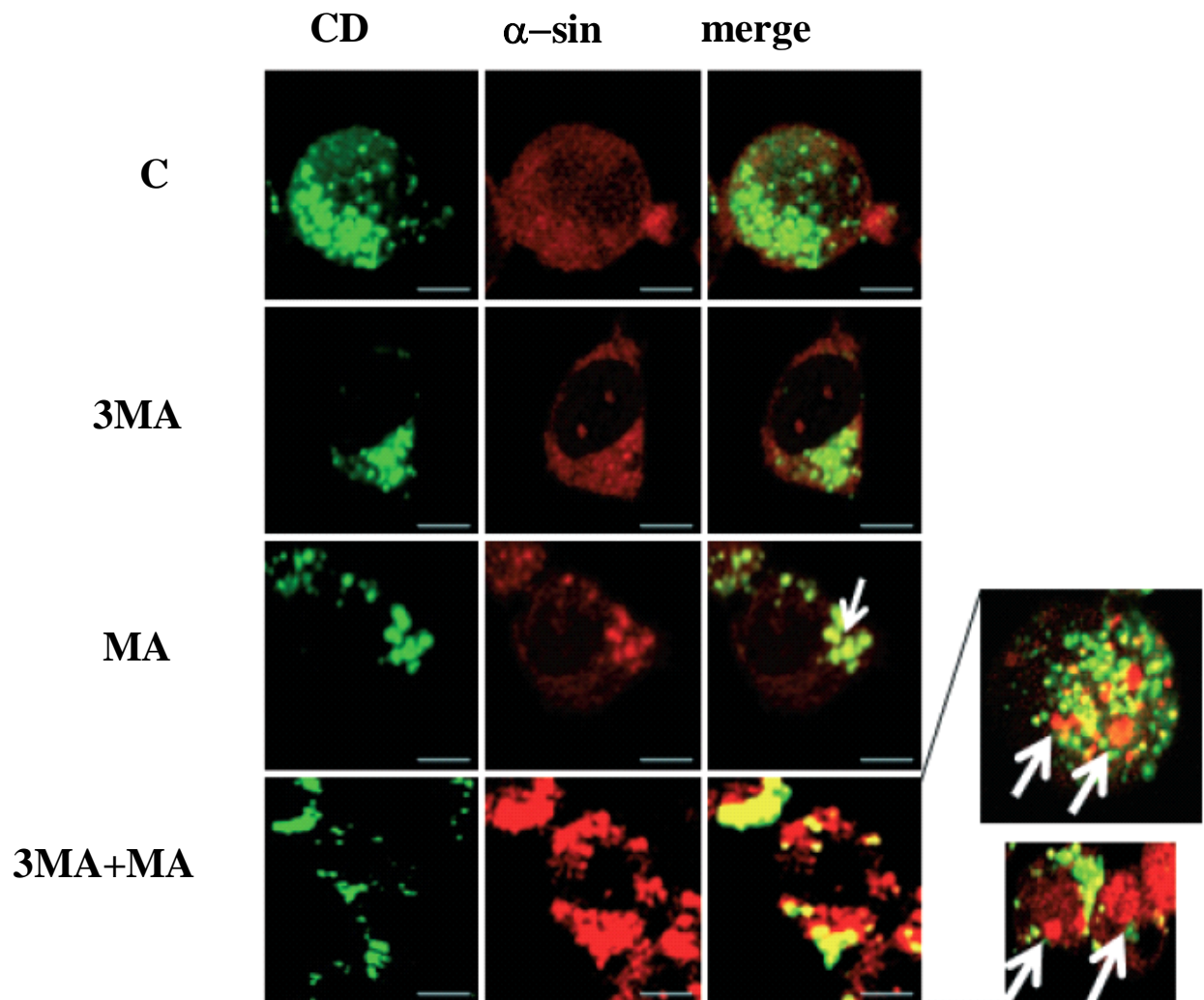


Figura 7.5. L'immagine illustra la traslocazione dell' α -sinucleina all'interno di vacuoli autofagici dopo MA, come dimostra la colocalizzazione tra α -sinucleina e catepsina D (CD, freccia). In presenza di un blocco dell'autofagia dopo 3MA questa colocalizzazione è ridotta e aggregati di α -sinucleina si accumulano nel citoplasma (freccia). La barra corrisponde a 5 μ m.

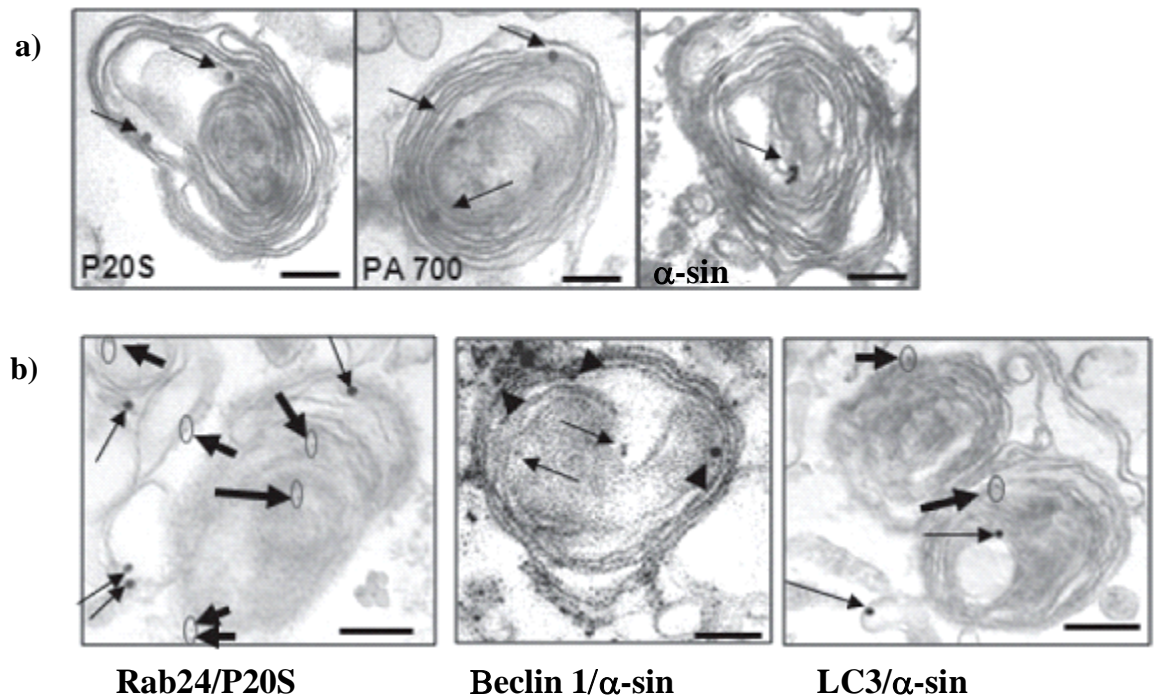


Figura 7.6. Analisi ultrastrutturale delle cellule PC12 esposte a MA. a) Inclusi citoplasmatici che presentano immunopositività per P20S, PA700 e α -sinucleina (freccia). b) Colocalizzazione tra Rab24, marcatore dell'autofagia e P20S e α -sinucleina e beclin 1 e LC3, marcatori dell'autofagia. La barra corrisponde a: a) 0,23 μ m; b) 0,35 μ m, 0,23 μ m; 0,26 μ m rispettivamente.

7.2 Analisi delle frazioni cellulari

Le centrifugazioni differenziali successive a cui sono state sottoposte le cellule PC12 trattate con MA 1 μM per 72 ore hanno fornito quattro tipi di campioni (frazioni cellulari) ognuna caratterizzata da un organulo specifico;

Frazione 1: ottenuta dopo centrifugazione a 200 g per 10 minuti, caratterizzata dalla presenza di cellule danneggiate e parzialmente rotte;

Frazione 2: questa frazione si ottiene dopo centrifugazione a 2000 g per 10 minuti ed è costituita da nuclei cellulari intatti;

Frazione 3: dopo centrifugazione a 12000 g per 20 minuti, caratterizzata dalla presenza di mitocondri intatti;

Frazione 4: una centrifugazione maggiore (20000 g per 1 ora) permette di ottenere un campione costituito da microsomi e vescicole.

L'analisi ultrastrutturale di questi campioni ha evidenziato che le inclusioni citoplasmatiche precipitano insieme agli organuli caratteristici di ogni frazione. La frazione che presenta una densità maggiore di inclusioni è risultata essere la frazione 3 ossia quella caratterizzata dalla presenza dei mitocondri ($0,54 \pm 0,01$ contro $0,22 \pm 0,02$ nella frazione 2 e $0,3 \pm 0,04$ nella frazione 4) (Figura 7.7). Inoltre gli inclusi si presentano nelle diverse frazioni a stadi maturativi diversi. Quelli ancora immaturi (stadio 1) sono prevalenti nella frazione 4 (frazione microsomiale), lo stadio intermedio (stadio 2) è

predominante nella frazione 3 (frazione mitocondriale), mentre lo stadio maturativo più avanzato (stadio 3) è maggiormente presente nella frazione microsomiale e nella frazione nucleare (Fig 7.8).

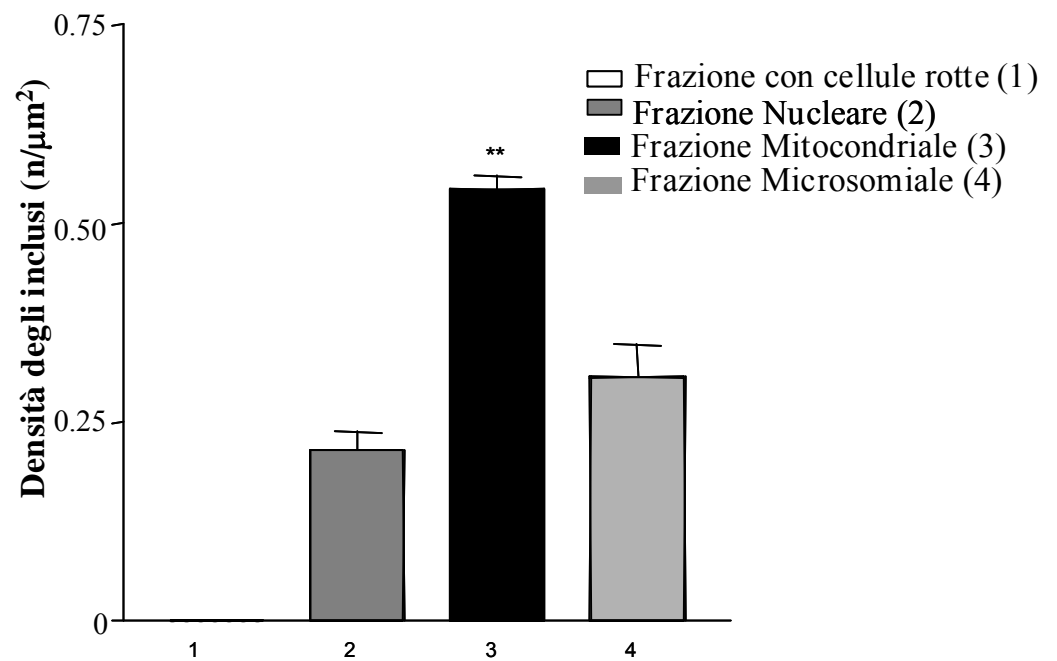


Figura 7.7. Distribuzione degli inclusi nelle diverse frazioni cellulari. **p< 0,05 vs frazione 1, 2 e 4.

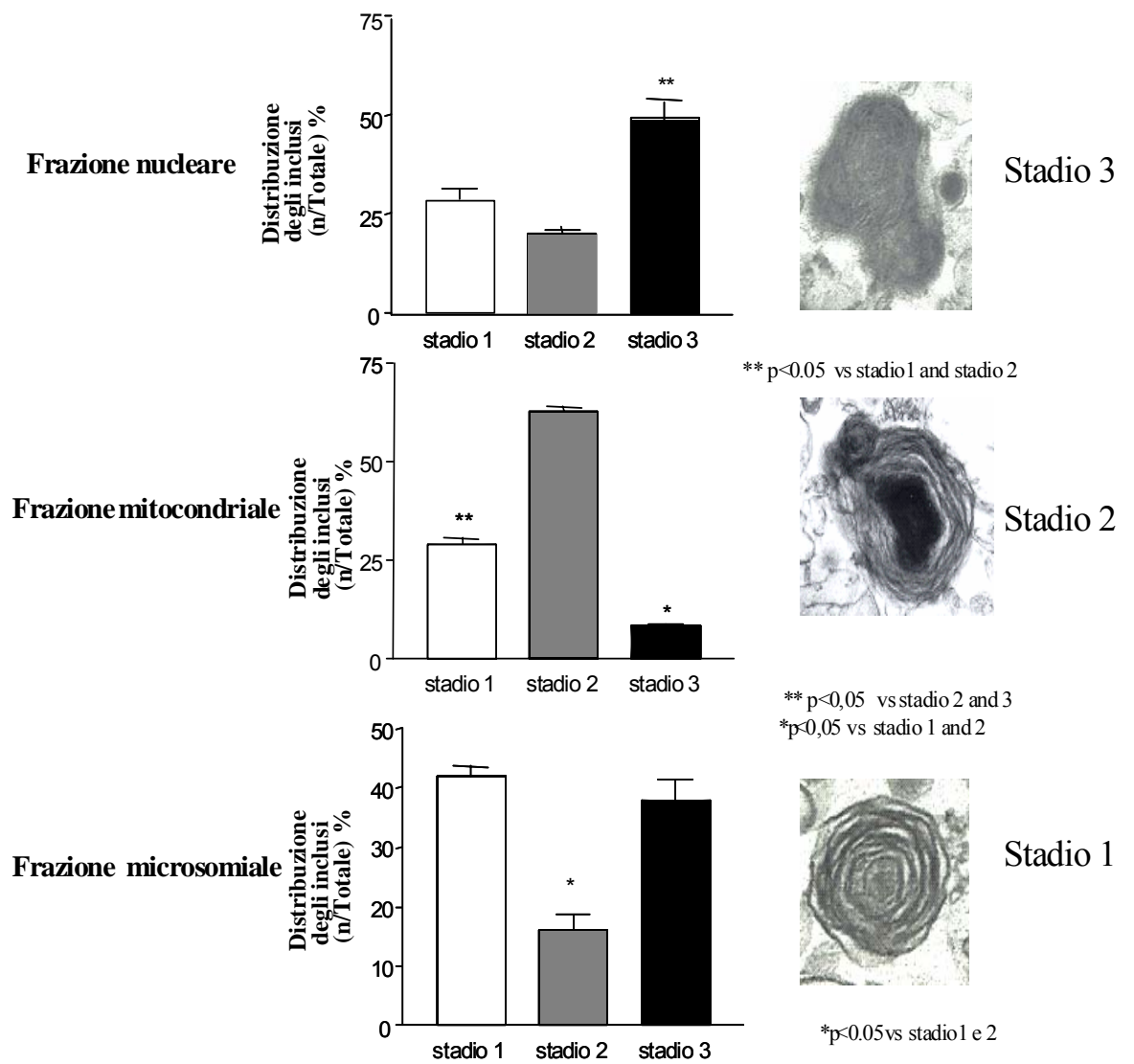


Figura 7.8: Distribuzione degli inclusi ai diversi stadi maturativi nelle diverse frazioni cellulari.

L'analisi immunocitochimica è stata effettuata selettivamente sulla frazione mitocondriale, in quanto è quella che contiene il maggior numero di inclusi e a tutti e tre gli stadi maturativi. In tale frazione, gli inclusi citoplasmatici allo stadio 1 sono positivi per l' α -sinucleina che si localizza in periferia (Figura 7.9 a). Gli inclusi agli stadi maturativi successivi (stadi 2 e 3) mostrano una doppia positività per l' α -sinucleina e l'ubiquitina (Figura 7.9 b).

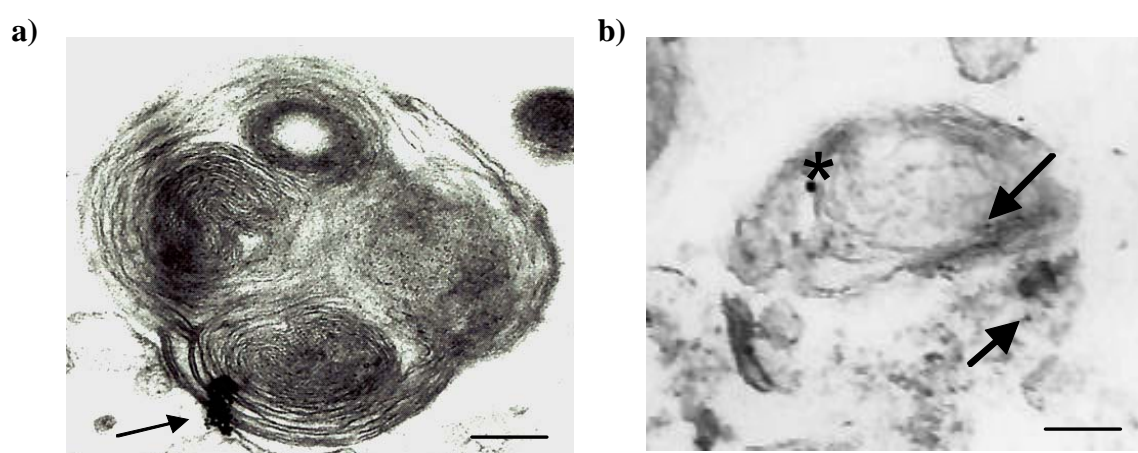


Figura. 7.9. Immagine di immuno microscopia elettronica a trasmissione che illustra la localizzazione dell' α -sinucleina e dell'ubiquitina negli inclusi della frazione mitocondriale. a) α -sinucleina (freccia) in un incluso di uno stadio precoce; (b) α -sinucleina (freccia) e ubiquitina (asterisco) in un incluso di uno stadio avanzato. La barra corrisponde a: a) 0,2 μ m; b) 0,25 μ m.

7.3 Analisi della morfologia dei mitocondri

Come evidenziato nelle foto della Fig.7.10, abbiamo osservato notevoli cambiamenti a livello mitocondriale nelle cellule PC12 trattate con MA. Le cellule di controllo mostrano mitocondri ben conformati con cristelle ben preservate e matrice elettrondensa (Fig. 7.10 a); mentre, nelle cellule trattate con MA sono presenti mitocondri alterati che presentano diluizione della matrice e cristelle frammentate (Fig 7.10 b) Questi effetti sono espressi quantitativamente dall'analisi morfometrica ultrastrutturale riportata in Fig.7.10 d. Il numero dei mitocondri totali per cellula rimane pressoché invariato dopo trattamento con MA (Fig. 7.10 c).

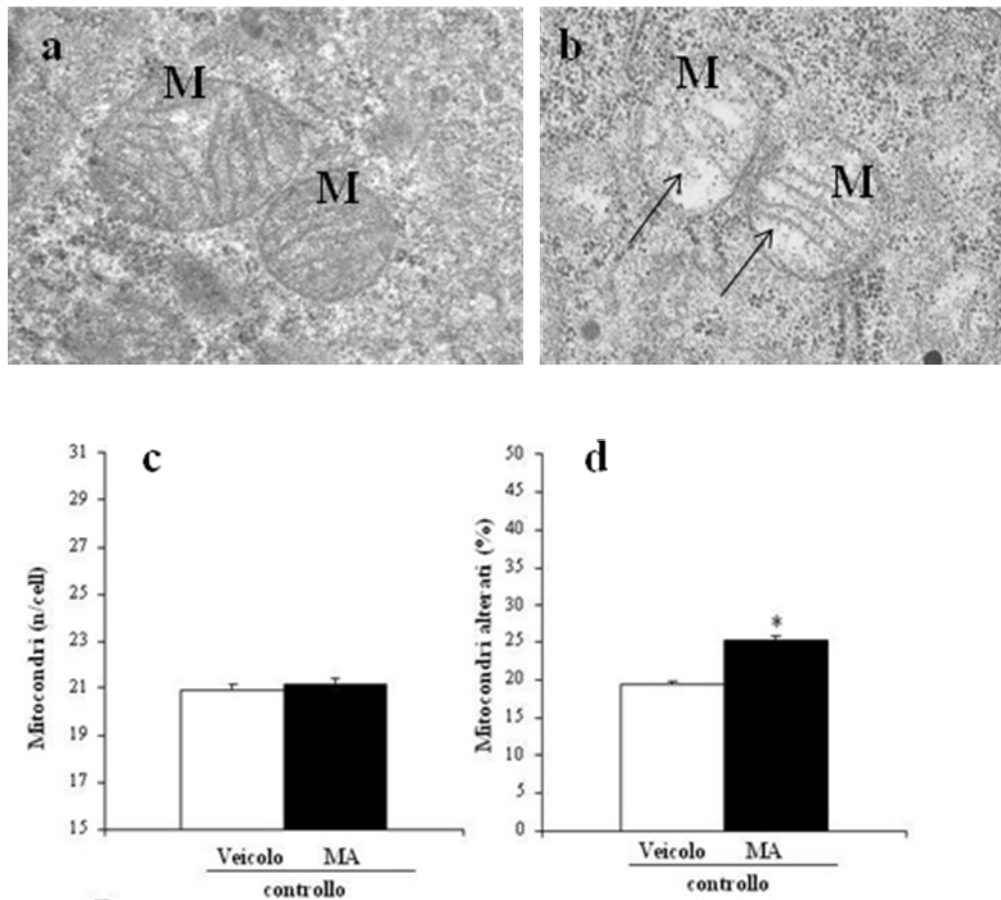


Fig.7.10. I mitocondri di una cellula di controllo appaiono ben preservati con una matrice elettrondensa e cristie ben organizzate (Fig. a); mentre i mitocondri di una cellula trattata con MA appaiono alterati (freccie) con matrice diluita e cristie frammentate (Fig. b). I grafici nessun cambiamento nel numero dei mitocondri (Fig. c) mentre è evidente un significativo aumento della percentuale di mitocondri alterati (Fig. d) nelle cellule PC12 trattate con MA rispetto al controllo. * $p < 0.001$ vs altri gruppi.
M: mitocondri

7.4 Analisi della morte programmata per apoptosi

La Microscopia Elettronica a Trasmissione rappresenta il gold standard per distinguere a livello cellulare non solamente le strutture connesse alla via autofagica ma anche i fenomeni cellulari riconducibili al processo apoptotico. Abbiamo esteso, a tal scopo, le nostre conte al numero di cellule apoptotiche presenti nelle cellule di controllo che dopo somministrazione di MA. Dopo trattamento con MA si assiste a una tipica morte apoptotica caratterizzata dalla marginalizzazione della cromatina come mostrato nella Fig 7.11 b rispetto al controllo (Fig. 7.11 a). L'analisi quantitativa ha confermato l'aumento significativo di cellule apoptotiche dopo somministrazione di MA (Fig 7.11 c)

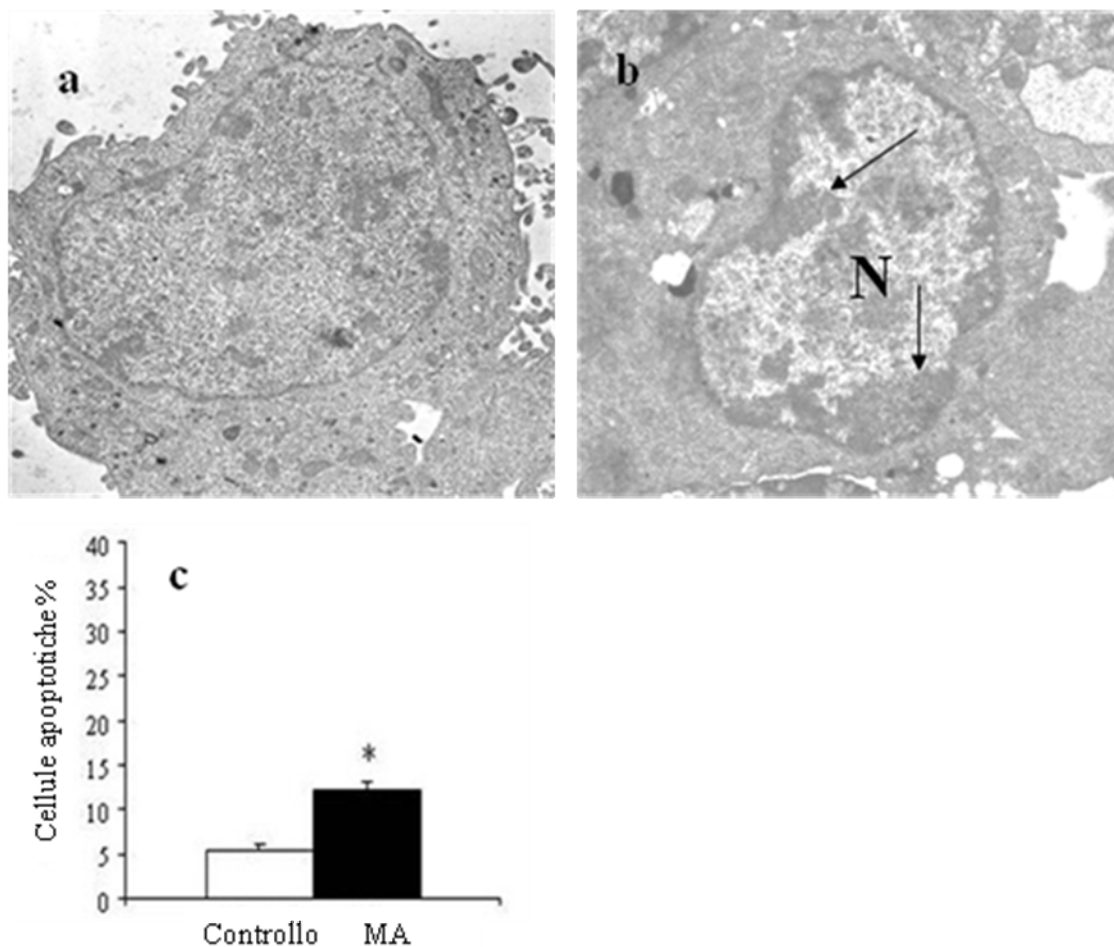


Fig 7.11 Una cellula di controllo possiede un normale aspetto dei compartimenti nucleare e citoplasmatico (Fig. a) mentre dopo somministrazione con MA una cellula PC12 mostra marginalizzazione e condensazione della cromatina (freccie), la presenza di un nucleolo apoptotico, vacuolizzazione del citoplasma (Fig b). L'analisi quantitativa ha evidenziato un significativo aumento delle cellule apoptotiche dopo trattamenti (Fig. c).

N: nucleo

Poiché nelle cellule sottoposte a stress ossidativo, l'alterazione della permeabilità della membrana esterna dei mitocondri, è probabilmente il meccanismo responsabile per l'attivazione delle caspasi, mentre l'autofagia rimuovendo mitocondri danneggiati, previene l'insorgenza di apoptosi. A tale scopo abbiamo investigato se l'inibizione della via autofagica induce accumulo di mitocondri alterati nelle cellule trattate con MA e se tale effetto possa determinare la morte cellulare. Per valutare la presenza dei mitocondri con un'alterata permeabilità di membrana, abbiamo impiegato un colorante fluorescente, il Mitotracker, il quale colora solamente i mitocondri funzionali. Contemporaneamente abbiamo analizzato la presenza della proteina bax mediante immunofluorescenza, Bax è una proteina appartenente alla famiglia delle bcl-2, la quale partecipa alla formazione dei pori di transizione nella membrana mitocondriale esterna. Bax è stato determinato nella sua forma attiva mediante un anticorpo monoclonale specifico per la sua porzione N-terminale. Nelle cellule di controllo e nelle cellule trattate solamente con MA o con 3-MA, la colorazione con il Mitotracker appariva intensa, come ci si aspettava per mitocondri normalmente conformati (Fig.7.12). In queste cellule, l'immunofluorescenza per bax ha evidenziato che tale proteina è presente nella cellula come singoli spot diffusi nel citoplasma. Viceversa, nelle cellule trattate con MA in presenza di 3-MA, la colorazione con il Mitotracker si presentava debole e dispersa, mentre bax appariva come spot addensati e intensamente

marcati (Fig. 7.12 freccia). Questo pattern mostrato da bax, è compatibile con la sua forma attivata sulla membrana mitocondriale e di conseguenza mostra l'alterata permeabilità del mitocondrio, evento che è alla base dell'attivazione della via delle caspasi e quindi della morte cellulare.

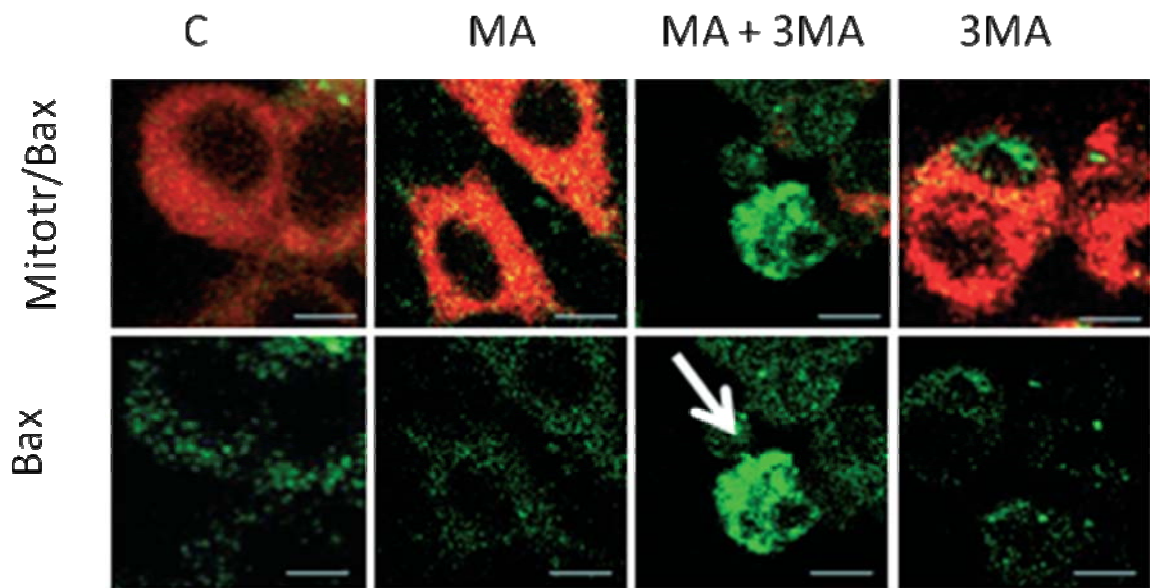


Fig 7.12 Le immagini mostrano che soltanto nelle colture cellulari trattate con MA e 3MA ci sono cellule in cui bax forma degli aggregati (freccie). In queste cellule i mitocondri non sono marcati indicando che non sono funzionanti. La barra corrisponde a 5 μ m. C= controllo

La morte cellulare per via apoptotica dopo inibizione della via autofagica con 3 MA e somministrazione con MA ,è stata valutata con la microscopia elettronica come è dimostrato nelle immagini significative in Fig. 7.1. Con il doppio trattamento MA/3MA, si può notare un particolare disfacimento cellulare con la presenza di

grossi vacuoli che ristagnano nel citosol e concomitante marginalizzazione della cromatina nel nucleo.

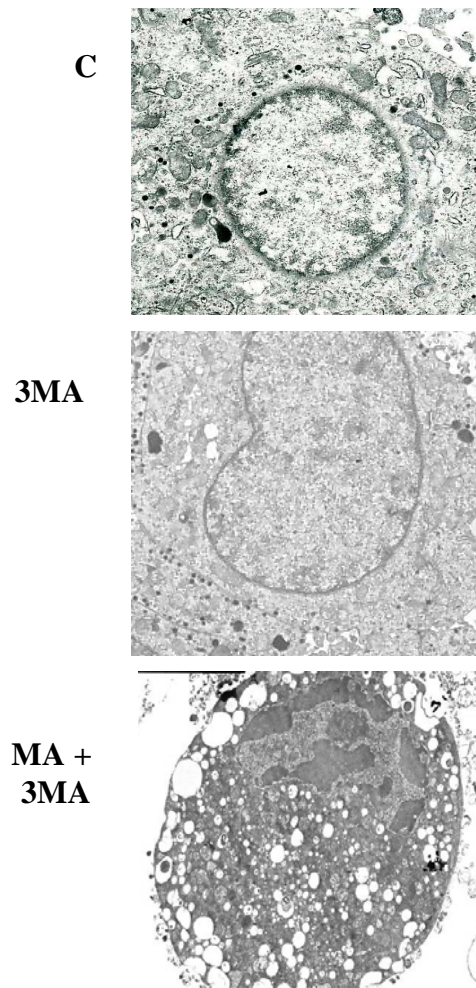


Figura 7.13. Effetto della inibizione dell'autofagia dopo esposizione a MA ($1\mu\text{M}$) per 24 ore. La barra corrisponde a: $1,96\mu\text{m}$. C= controllo.

8 DISCUSSIONE

Da tempo è noto che la MA è tossica per i neuroni dopaminergici del sistema nigro-striatale, dei quali causa degenerazione dei terminali. Inoltre, la MA induce nel soma di questi neuroni dopaminergici la formazione di inclusioni citoplasmatiche che contengono α -sinucleina e proteine del sistema UP (Maries *et al.*, 2003; Fornai *et al.*, 2004). Altri studi riportano come gli effetti tossici della MA siano mediati anche dal sistema autofagico, come testimonia la presenza di vacuoli nel citoplasma dei neuroni esposti a questa tossina (Cubells *et al.*, 1994; Larsen *et al.*, 2002; Fornai *et al.*, 2004).

Non è chiaro quale sia la relazione tra i vacuoli autofagici e le inclusioni che sono positive per proteine del sistema UP.

Il presente lavoro di ricerca si è proposto di indagare, da un punto di vista ultrastrutturale, il processo di formazione delle inclusioni citoplasmatiche indotte da MA e il significato dell'autofagia in relazione alla morte cellulare.

L'autofagia è un sistema che concorre al mantenimento dell'omeostasi cellulare assicurando la degradazione di componenti cellulari danneggiati o alterati (Cuervo, 2004). Tuttavia l'autofagia in alcuni casi è associata con la morte cellulare (Bursch, 2001; Levine e Yuan, 2005). Pertanto la dimostrazione del fatto che molte malattie neurodegenerative sono

caratterizzate dalla presenza di aggregati proteici e strutture simili ai vacuoli autofagici, non chiarisce se l'autofagia contribuisca alla sopravvivenza o alla morte cellulare (Bredesen *et al.*, 2006; Nixon, 2006).

Questo studio è stato condotto su una linea cellulare derivante da un feocromocitoma di ratto, le cellule PC12. Le cellule PC12 in coltura offrono il vantaggio di fornire un modello cellulare semplice di neurone dopaminergico, utile per lo studio dei meccanismi alla base della formazione delle inclusioni citoplasmatiche indotte dalla MA. Infatti, le cellule PC12 sono cellule catecolaminergiche capaci di sintetizzare e rilasciare DA (Fornai *et al.*, 2007).

Le cellule PC12 sono state esposte a MA a dosi crescenti (0,001-1 μ M) e per tempi diversi (4h-168h).

I risultati ottenuti confermano che la MA è in grado di indurre inclusioni citoplasmatiche che presentano una morfologia sovrapponibile a quelle osservate *in vivo* (Fornai *et al.*, 2004) e in colture di neuroni mesencefalici (Cubells *et al.*, 1994, Larsen *et al.*, 2002) dopo trattamento con MA. Le inclusioni, al microscopio elettronico, appaiono formate da strati multilamellari di membrane avvolte a spirale, che circondano un materiale elettrondenso in cui talvolta è possibile riconoscere la presenza di un mitocondrio. Il fatto che siano riconoscibili mitocondri all'interno delle inclusioni è in linea con l'ipotesi che tali strutture possano rappresentare vacuoli autofagici. A conferma di ciò,

l'analisi immunocitochimica dimostra che questi inclusi citoplasmatici sono positivi per proteine markers del sistema autofagico (rab 24, LC3 e beclin).

Queste inclusioni citoplasmatiche modificano la propria ultrastruttura in modo tempo-dipendente tanto che è stato possibile osservarne la maturazione. Tali inclusioni perdono infatti progressivamente gli strati multilamellari ed evolvono, attraverso forme intermedie, in tipiche inclusioni con una porzione centrale fortemente elettrondensa. Successivamente le membrane si fondono determinando una struttura molto compatta.

L'indagine sulla maturazione di tali inclusioni è di notevole interesse alla luce dell'ipotesi che anche i LB, caratteristica ultrastrutturale della MdP, possano evolvere nel corso del tempo fino a raggiungere la loro conformazione classica; infatti, le inclusioni *cloud-like*, considerate come iniziali, evolverebbero verso forme terminali più compatte e condensate (Gomez-Tortosa *et al.*, 2000).

Un altro aspetto di particolare interesse è rappresentato dal fatto che questi inclusi citoplasmatici risultano positivi, oltre per proteine markers del sistema autofagico anche per l' α -sinucleina e proteine appartenenti al sistema UP (P20S e PA700). Pertanto si dimostra che vi è una stretta relazione morfologica e funzionale tra i vacuoli del sistema autofagico e le inclusioni positive per il sistema UP, già descritte dopo esposizione con MA (Fornai *et al.*, 2004).

L'esposizione delle cellule PC12 alla MA alla concentrazione di 1 μ M è in grado di indurre la comparsa di inclusioni positive per proteine autofagiche.

L' α -sinucleina in forma di aggregati che si formano dopo esposizione a MA vengono degradati sia dalla via autofagica che dal sistema ubiquitina proteasoma come dimostrato dalla presenza negli aggregati sia di proteine legate al sistema UP che all'autofagia.

D'altra parte, Webb e collaboratori hanno dimostrato nelle cellule PC12 che la forma *wild type* e anche la forma mutata dell' α -sinucleina sono degradate mediante autofagia (Webb *et al.*, 2003). Gli stessi autori suggeriscono che la forma solubile dell' α -sinucleina sia degradata dal sistema UP, mentre gli aggregati di α -sinucleina siano degradati dall'autofagia (Webb *et al.*, 2003). In particolare, un altro studio dimostra che la forma *wild type* dell' α -sinucleina viene preferenzialmente degradata attraverso l'autofagia mediata dalle chaperonine e quindi senza la formazione dell'autofagolisosoma (Cuervo *et al.*, 2004).

Pertanto, i nostri risultati suggeriscono che in presenza di MA l' α -sinucleina alterata dallo stress ossidativo possa perdere la capacità di legarsi a Lamp2a, il recettore lisosomiale coinvolto nell'autofagia mediata dalle chaperonine, e tenda a formare aggregati insolubili che sono sequestrati nei lisosomi e degradati mediante la (macro)autofagia. Tuttavia la MA induce anche una alterazione mitocondriale che porta insieme all' eccesso di proteine misfolded

una inibizione della via autofagica. Che eventualmente porta alla morte cellulare per apoptosi.

Per studiare in maniera più approfondita le caratteristiche morfologiche e antigeniche di una singola inclusione, campioni di cellule PC12 esposte a MA alla concentrazione di 1 μ M per 72h (concentrazione e tempo a cui si ha il maggior numero di inclusioni citoplasmatiche per cellula) sono stati sottoposti a centrifugazioni successive per ottenere frazioni cellulari.

I risultati che abbiamo ottenuto hanno evidenziato che gli inclusi con differente stadio di maturazione si distribuiscono in maniera diversa nelle frazioni cellulari. Nella frazione mitocondriale, in cui si osserva anche il maggior numero di inclusi, le inclusioni più rappresentate appartengono allo stadio 2, mentre le inclusioni di stadio 1 sono osservabili in numero maggiore nella frazione microsomiale e quelle di stadio 3 sia in quella nucleare che in quella microsomiale. Quest'ultimo dato dimostra che la progressiva perdita delle membrane provoca una compattazione che non è direttamente proporzionale ad una densità maggiore dell'inclusione e che, pertanto, allo stadio 3, coincidente al più avanzato stadio maturativo, appartiene una popolazione eterogenea di inclusi per densità e dimensioni, come se nel corso della maturazione alcuni inclusi perdessero del materiale e ciò li rendesse in qualche modo meno densi e quindi reperibili anche nella frazione microsomiale.

All'esame ultrastrutturale gli inclusi della frazione mitocondriale appartenenti allo stadio 1 si marcano per l' α -sinucleina ma non per l'ubiquitina. Del resto anche in pazienti affetti da MdP esiste una popolazione di inclusioni che non si marcano per l'ubiquitina, ma soltanto per l' α -sinucleina (Gomez-Tortosa *et al.*, 2000). Ad uno stadio più maturo, le inclusioni della frazione mitocondriale presentano una marcatura sia per l'ubiquitina che per l' α -sinucleina.

L'osservazione al TEM degli stessi preparati dopo immunocitochimica per l'ubiquitina, mostra una intensa marcatura per questa proteina. In pratica, la poliubiquitina o proteine poliubiquitinate si andrebbero a collocare proprio all'interno delle inclusioni di cui la frazione mitocondriale è particolarmente ricca. Tra le proteine poliubiquitinate, probabilmente, si trova l' α -sinucleina.

Questi dati suggeriscono che alla base della formazione delle inclusioni MA-dipendenti ci possa essere un processo *multi-step* in cui un meccanismo iniziale scatena una risposta biologica che porta alla formazione delle inclusioni. L'elemento critico che innesci tale evento potrebbe essere la DA. Infatti la MA induce un elevato rilascio di DA citosolica che è immediatamente convertita in DA-chinone, con la produzione di specie reattive dell'ossigeno (Sulzer, 2001; Fornai *et al.*, 2003; Fornai *et al.*, 2004).

La persistenza dello stimolo tossico e dello stress ossidativo porterebbe alla formazione di aggregati di natura proteica che sono tossici per la cellula e

che vengono rimossi mediante il sistema UP e il sistema autofagico. D'altra parte, studi *in vivo* hanno dimostrato che dopo esposizione a MA le cellule dopaminergiche della SN che presentano inclusioni citoplasmatiche sono risparmiate dalla morte cellulare (Fornai *et al.*, 2004) e nei pazienti affetti da MdP i LB sono presenti in quei neuroni che sopravvivono alla neurodegenerazione.

Da qui si può dedurre che quelle cellule che non sono capaci di attivare un meccanismo di difesa soccombono all'insulto tossico.

Nonostante si conosca la clinica degli effetti della MA e sia nota l'alterazione anatomica, rimane tuttavia non chiaro il meccanismo che conduce all'alterazione sub cellulare e quindi alla perdita dei terminali dopaminergici.

Per tale motivo conoscendo già gli effetti della MA sull'anatomia del sistema dopaminergico in vivo, abbiamo utilizzato un sistema riduttivo in cui il solo componente biologico fosse rappresentato da una linea cellulare dopaminergica in assenza di altri fenotipi neuronali o gliali. In questo modo abbiamo ridotto notevolmente le variabili sperimentali ed abbiamo limitato l'analisi proprio a quelle strutture cellulari che in vivo vengono colpite maggiormente. Questo approccio riduttivo consente di approfondire il livello di analisi della tossicità da MA ai più fini aspetti sub-cellulari, garantendo inoltre una notevole ridondanza delle strutture bersaglio rappresentate dalle uniche componenti della coltura cellulare cioè le cellule dopaminergiche.

In questo modo appare evidente come la MA produca morte cellulare e perdita di sostanza (riduzione dei terminali) attraverso un processo che coinvolge la degradazione autofagica di componenti cellulari danneggiate. Queste componenti cellulari consistono in proteine anomale (α -sinucleina) e organuli alterati. In particolare questo studio ha evidenziato una quantità imponente di mitocondri alterati che si formano in seguito all'esposizione a MA. La degradazione di queste strutture anomale rappresenta un aspetto critico nel condizionare la sopravvivenza delle cellule dopaminergiche. Sembra infatti che l'aumento di strutture autofagiche abbia un significato compensatorio legato alla rimozione di proteine e di mitocondri alterati. Il potenziamento di questo meccanismo compensatorio indotto spontaneamente porta protezione del danno indotto da MA. I risultati di questo studio pertanto portano a: 1- riconsiderare il ruolo dei componenti cellulari nella tossicità da MA, 2- offrono un potenziale meccanismo protettivo per contrastare la tossicità da MA, 3- vista la sovrapposizione clinica e anatomica tra gli effetti della MA e le patologie neuropsichiatriche vi sono due importanti implicazioni: a) la MA potrebbe offrire un modello per comprendere la patologia cellulare operante in queste patologie; b) i meccanismi di protezione che antagonizzano il danno da MA potrebbero essere validi strumenti terapeutici per contrastare le stesse malattie neuropsichiatriche.

Pertanto questo studio rappresenta un tentativo sperimentale per dimostrare i meccanismi neurobiologici legati all'abuso di sostanze e a specifiche condizioni psicopatologiche. Come psicologo ho svolto questa ricerca motivato dall'emergenza dei disturbi psichiatrici e dell'abuso di sostanze con preciso scopo di comprenderne i meccanismi e le sovrapposizioni anatomiche. Il risultato ottenuto offre una mirabile sovrapposizione tra queste condizioni suggerendo anche una base biologica sub-cellulare che possa giustificare la frequenza delle doppie diagnosi (disturbi d'abuso e patologia).

9 BIBLIOGRAFIA

Abeliovich A, Schmitz Y, Fariñas I, Choi-Lundberg D, *et al.* (2000) Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron.*, 25; 239-252

Allcot JV ,Barnhart, R.A.; and Mooney, L.A. *et al.*(1987) Acute lead poisoning in two users of illicit methamphetamine. *JAMA* 258(4);510-511 1987

Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero MT, *et al.* (1997) Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol.* 12; 25-31

Axt K.J., Commins D.L., Vosmer G., Seiden L.S. (1990). alpha-Methyl-p-tyrosine pretreatment partially prevents methamphetamine-induced endogenous neurotoxin formation. *Brain Res.* 515; 269-276

Arima K, Uéda K, Sunohara N, *et al.* (1998) Immunoelectron-microscopic demonstration of NACP/alpha-synuclein-epitopes on the filamentous component of Lewy bodies in Parkinson's disease and in dementia with Lewy bodies. *Brain Res.* 808; 93-100

Arico S, Petiot A, Bauvy C, Dubbelhuis PF, *et al.* (2001) The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem.* 276; 35243-35246

- Bence NF, Sampat RM, Kopito RR. (2001) Impairment of the ubiquitin proteasome system by protein aggregation. *Science* 292; 1552-1555
- Beyer K, Domingo-Sábat M, Ariza A. (2009) Molecular pathology of Lewy body diseases. *Int J Mo. Sci.* 10; 724-745
- Biasini E, Fioriti L, Ceglia I, Invernizzi *et al.* (2004) Proteasome inhibition and aggregation in Parkinson's disease: a comparative study in untransfected and transfected cells. *J. Neurochem.* 88; 545–553
- Boveris A., Costa L.E., Poderoso J.J., Carreras M.C., Cadenas E. (2000) Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci.* 899; 121-135
- Braak H, Braak E, Yilmazer D, Schultz C, *et al.* (1995) Nigral and extranigral pathology in Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 46: 15-31
- Bredesen DE, Rao RV, Mehlen P. (2006) Cell death in the nervous system. *Nature.* 443; 796–802
- Brown J.M., Hanson G.R., Fleckenstein A.E. (2001) Regulation of the vesicular monoamine transporter-2: a novel mechanism for cocaine and other psychostimulants. *J Pharmacol Exp Ther.*, 296:762-776
- Bursch W. (2001) The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 8; 569–581

Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, *et al.* (2002). Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J Neurosci.* 22; 8797-8807

Cadet JL, Ladenheim B, Hirata H, *et al.* (1995) Superoxide radicals mediate the biochemical effects of methylenedioxy-methamphetamine (MDMA): evidence from using CuZn-superoxide dismutase transgenic mice. *Synapse* 21; 169–176.

Callaghan RC, Cunningham JK, Sykes J, Kish SJ, *et al.* (2012) Increased risk of Parkinson's disease in individuals hospitalized with conditions related to the use of methamphetamine or other amphetamine-type drugs. *Drug Alcohol Depend* 1;120(1-3); 35-40

Chandra S, Fornai F, Kwon HB, *et al.* (2004). Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101; 14966-14971

Charles V, Mezey E, Reddy PH, *et al.* (2000). Alpha-synuclein immunoreactivity of huntingtin polyglutamine aggregates in striatum and cortex of Huntington's disease patients and transgenic mouse models. *Neurosci.Lett.* 289; 29-32

Chang L, Ernst T, Speck O, Grob CS, *et al.* (2005). Additive effects of

HIV and chronic methamphetamine use on brain metabolite abnormalities. *Am J Psychiatry* 162(2):361–369; 2005

Chung KK, Dawson VL, Dawson TM. (2003) New insights into Parkinson's disease. *J Neurol.*; 250; 15-24

Ciechanover A, Brundin P. (2003) The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron*. 40; 427-446

Conway KA, Harper JD, Lansbury PT. (1998) Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat Med.*, 4; 1318-1320

Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, *et al.* (2000) Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 97; 571–576

Conway K.A., Rochet J.C., Bieganski R.M., Lansbury P.T. Jr. (2001) Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science*. 294; 1346-1349

Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 65:801–847

Criollo A, Vicencio JM, Tasdemir E, *et al.* (2007) The inositol trisphosphate receptor in the control of autophagy. *Autophagy*. 3; 350-353

Crossman AR (1989) Neural mechanisms in disorders of movement. *Comp Biochem Physiol A*; 93;141-149

Cubells J F, Rayport S, Rajendran G, Sulzer D. (1994) Methamphetamine neurotoxicity involves vacuolation of endocytic organelles and dopamine-dependent intracellular oxidative stress. *J. Neurosci.* 14; 2260–2271.

Cuervo A. M. (2004) Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.* 14; 70–77.

Cuervo AM., Stefanis L., Fredenburg R. *et al.* (2004) Impaired degradation of mutant α synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science*. 5688, 1292–1295.

DeLong MR. (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 13; 281-285

DeMartino GN, Slaughter CA (1999) The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J Biol Chem.* 274; 22123–22126

Dev KK, Hofele K, Barbieri S, *et al.* (2003) Part II: alpha-synuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology*, 45; 14-44

Dawson T, Mandir A, Lee M (2002) Animal models of PD: pieces of the same puzzle? *Neuron* 35; 219–222

- El-Agnaf OM, Irvine GB (2000). Review: formation and properties of amyloid-like fibrils derived from alpha-synuclein and related proteins. *J Struct Biol.*, 130; 300-309
- Eliezer D, Kutluay E, Bussell R Jr, Browne G. (2001) Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *J Mol Biol.* 307; 1061-1073
- Eskelinen EL. (2005) Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy.* 1; 1-10
- Feany MB, Bender WW. (2000). A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature*, 404; 394-398
- Ferrucci M, Pasquali L, Paparelli A, *et al.* (2008a) Pathways of methamphetamine toxicity. *Ann N Y Acad Sci.* 1139; 177-185
- Ferrucci M, Pasquali L, Ruggieri S, Paparelli A, Fornai F (2008b) Alpha-synuclein and autophagy as common steps in neurodegeneration. *Parkinsonism Relat Disord.* 14; 180-184
- Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli A, *et al.* Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature.* 2007 Jun 28;447(7148):1121-5.
- Fleckenstein AE, Metzger RR, Wilkins DG, Gibb JW, Hanson GR. (1997) Rapid and reversible effects of methamphetamine on dopamine transporters. *J Pharmacol Exp Ther.* 282; 834-838

Fornai F, Lenzi P, Gesi M, *et al.* (2003) Fine structure and biochemical mechanisms underlying nigrostriatal inclusions and cell death after proteasome inhibition. *J Neurosci.* 23; 8955-8966

Fornai F, Lenzi P, Gesi M, *et al.* (2004). Methamphetamine produces neuronal inclusions in the nigrostriatal system and in PC12 cells. *J Neurosci.*; 88: 114-113

Fornai F, Lenzi P, Lazzeri G, *et al.* (2007) A fine ultrastructure and biochemistry of PC12 cells: a comparative approach to understand neurotoxicity. *Brain Res.* 1129; 174-190.

Fornai F, Longone P, Cafaro *et al.* (2008) Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105; 2052-2057

Forno LS. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996; 55: 259-272.

Gai WP, Yuan HX, Li XQ, *et al.* (2000) In situ and in vitro study of colocalization and segregation of alpha-synuclein, ubiquitin, and lipids in Lewy bodies. *Exp Neurol.* 166; 324-333

Ghee M, Fournier A, Mallet J (2000) Rat alpha-synuclein interacts with Tat binding protein 1, a component of the 26S proteasomal complex. *J Neurochem.* 75; 2221-2224

Giasson BI, Uryu K, Trojanowski JQ, Lee VM. (1999) Mutant and wild type human alpha-synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies in vitro. *J Biol Chem.* 274; 7619-7622

Giasson BI, Lee VM. (2003) Are ubiquitination pathways central to Parkinson's disease? *Cell* 114; 1-8

Goedert M (2001) Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2; 492-501

Gomez-Tortosa E, Newell K, Irizarry MC, Sanders JL, Hyman BT. (2000) alpha-Synuclein immunoreactivity in dementia with Lewy bodies: morphological staging and comparison with ubiquitin immunostaining. *Acta Neuropathol.* 99; 352-357

Greenamyre JT. (1993) Glutamate-dopamine interactions in the basal ganglia: relationship to Parkinson's disease. *J Neural Transm Gen Sect.* 91; 255-269

Greenamyre JT, Betarbet R, Sherer TB. (2003) The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria. *Parkinsonism Relat Disord.* 9; 59-64

Hara T, Nakamura K, Matsui M, *et al.* (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature.* 441; 885-889

Hasegawa M, Fujiwara H, Nonaka T, *et al.* (2002) Phosphorylated alpha-synuclein is ubiquitinated in alpha-synucleinopathy lesions. *J Biol Chem.* 277; 49071-49076

Hicke L. (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 2; 195–201

Hochstrasser M (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* 30; 405–439

Hoglinger GU, Carrard G, Michel PP, *et al.* Dysfunction of mitochondrial complex I and the proteasome: interactions between two biochemical deficits in a cellular model of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2003; 86:1297-1307

Hornykiewicz O. (2001). Dopamine and Parkinson's disease. A personal view of the past, the present, and the future. *Adv. Neurol.* 86; 1-11

Iacovelli L, Fulceri F, De Blasi A, *et al.* (2006) The neurotoxicity of amphetamines: bridging drugs of abuse and neurodegenerative disorders. *Exp Neurol.* 201; 24-31

Imam SZ, el-Yazal J, Newport GD, *et al.* (2001) Methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity: role of peroxynitrite and neuroprotective role of antioxidants and peroxynitrite decomposition catalysts. *Ann N Y Acad Sci.* 939; 366-380

Iwai A., Masliah E, Yoshimoto M, *et al.* (1995) The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron.* 14; 467-475

Jellinger K.A. (2003). Neuropathological spectrum of synucleinopathies. *Mov.Disord.* 18; 2-12

Kabuta T, Suzuki Y, Wada K. (2006) Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant Cu,Zn-superoxide dismutase proteins by macroautophagy and the proteasome. *J Biol Chem.* 281; 30524-30533

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, *et al.* (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature.* 392; 605-8.

Klionsky DJ, Emr SD. (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science.* 290; 1717-1721

Komatsu M, Waguri S, Chiba T, *et al.* (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature.* 441; 880-884

Krüger R, Kuhn W, Müller T, *et al.* (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet.* 18(2); 106-108.

Kuczenski R., Segal D.S., Cho A.K., Melega W. (1995). Hippocampus norepinephrine, caudate dopamine and serotonin, and behavioral responses to the stereoisomers of amphetamine and methamphetamine. *J Neurosci.* 15; 1308-1317

Larsen KE, Fon EA, Hastings TG. *et al.* (2002) Methamphetamine induced degeneration of dopaminergic neurons involves autophagy and upregulation of dopamine synthesis. *J. Neurosci.* 22; 8951–8960

Lee HJ, Khoshaghideh F, Patel S, Lee SJ. (2004) Clearance of alpha-synuclein oligomeric intermediates via the lysosomal degradation pathway. *J Neurosci.* 24; 1888-1896

Lemasters J.J., Qian T., Bradham C.A., *et al.* (1999). Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J Bioenerg Biomembr.* 31; 305-319.

Lenzi P, Fulceri F, Lazzeri G, *et al.* (2008) Analysis of single, purified inclusions as a novel approach to understand methamphetamine neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci.* 1139; 186-190

Levine B, Yuan J. (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest.* 115; 2679–2688.

Lewy FH. (1912) Paralysis agitans. In: *Handbuch der Neurologie*, Springer, Berlin.; 920-933.

Liang C, Feng P, Ku B, Oh BH, Jung JU. (2007) UVRAG: a new player in autophagy and tumor cell growth. *Autophagy.* 3; 69-71

Li L, Zhang X, Le W. (2008) Altered macroautophagy in the spinal cord of SOD1 mutant mice. *Autophagy.* 4; 290-293

London ED , Simon SL, Berman SM.(2004) : Mood disturbances and regional cerebral metabolic abnormalities in recently abstinent methamphetamine abusers. *Arch Gen Psychiatry* 61(1); 73–84

Lukas SE. (1997) Proceedings of the national consensus meeting on the use, abuse and sequelae of abuse of methamphetamine with implications for prevention, treatment and research. *Substance Abuse and Mental Health Administration; DHHS Publication SMA*, Rockville, MD.

Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. (2005) Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6; 439-448

Mandell AJ, Morgan M. (1970) Amphetamine induced increase in tyrosine hydroxylase activity. *Nature.* 227; 75-76

Mantle T.J., Tipton K.F., Garrett N.J. (1976). Inhibition of monoamine oxidase by amphetamine and related compounds. *Biochem Pharmacol.* 25; 2073-2077

Maries E, Dass B, Collier T. J. *et al.* (2003) The role of alpha-synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models. *Nat. Rev. Neurosci.* 4; 727–738

Marino G, Lopez-Otin C. (2004). Autophagy: molecular mechanism, physiological functions and relevance in human pathology. *Cell. Mol. Life. Sci.* 61; 1439-1454

Martin LJ, Liu Z, Chen K, *et al.* (2007) Motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mutant superoxide dismutase-1 transgenic mice: mechanisms of mitochondriopathy and cell death. *J Comp Neurol.* 500; 20-46

McNaught KS, Jenner P. (2001) Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 297; 191-194

McNaught KS, Mytilineou C, Jnoubaptiste R, *et al* (2002) Impairment of the ubiquitin–proteasome system causes dopaminergic cell death and inclusion body formation in ventral mesencephalic cultures. *J Neurochem* 81:301–306

Meredith GE, Halliday GM, Totterdell S. (2004) A critical review of the development and importance of proteinaceous aggregates in animal models of Parkinson's disease: new insights into Lewy body formation. *Parkinson Relat Des.* 10: 191-202.

Morimoto N, Nagai M, Ohta Y, *et al.* (2007) Increased autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain Res.* 1167; 112-117

Morrison BM, Gordon JW, Ripps ME, Morrison JH. (1996) Quantitative immunocytochemical analysis of the spinal cord in G86R superoxide dismutase transgenic mice: neurochemical correlates of selective vulnerability. *J Comp Neurol.* 373; 619-631

Mosharov EV, Staal RG, Bové J, *et al.* (2006) Alpha-synuclein overexpression increases cytosolic catecholamine concentration. *J Neurosci.* 26; 9304-9311

Munafo DB, e Colombo MI. (2002) Induction of autophagy causes dramatic changes in the subcellular distribution of GFP-Rab24. *Traffic* 3; 472–482.

Murphy DD, Rueter SM, Trojanowski JQ, Lee VM. (2000). Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the

presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J Neurosci.* 20; 3214-3220

Narhi L, Wood SJ, Steavenson S, *et al.* (1999). Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. *J Biol Chem.* 274; 9843-9846

Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol.* 183; 795-803

Nixon R. A. (2006) Autophagy in neurodegenerative disease: friend, foe or turncoat? *Trends Neurosci.* 29; 528–535.

Nordahl TE, Salo R, Leamon M. (2003) Neuropsychological effects of chronic methamphetamine use on neurotransmitters and cognition: a review. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 15: 317-325

Norris E. H., Giasson B. I., Hodara R. *et al.* (2005) Reversible inhibition of alpha-synuclein fibrillization by dopaminechrome-mediated conformational alterations. *Biol. Chem.* 280; 212–221.

Norris EH, Giasson BI, Lee VM (2004). Alpha-synuclein: normal function and role in neurodegenerative diseases. *Curr Top Dev Biol.* 60; 17-54

Obara K, Ohsumi Y. (2008) Dynamics and function of PtdIns(3)P in autophagy. *Autophagy.* 4; 952-954

Pattingre S, Tassa A, Qu X, *et al.* (2005) Levine B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*. 122; 927-939

Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, Meijer AJ, Codogno P. (2000) Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signalling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem*. 275; 992-998

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, *et al* (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 27; 2045-2047

Quan L., Ishikawa T., Michiue T. *et al.* (2005) Ubiquitin immunoreactive structures in the midbrain of Methamphetamine abusers. *Leg. Med. (Tokyo)* 7, 144-150

Qin ZH, Wang Y, Kegel KB, *et al.* (2003) Autophagy regulates the processing of amino terminal huntingtin fragments. *Hum Mol Genet*. 12; 3231-3244

Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, *et al.* (2004) Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet*. 36; 585-595

Ravikumar B, Sarkar S, Rubinsztein DC. (2008) Clearance of mutant aggregate-prone proteins by autophagy. *Methods Mol Biol*. 445; 195-211

Ricaurte GA., Guillery RW, Seiden LS, Schuster CR, Moore RY (1982) Dopamine nerve degeneration produced by high doses of methamphetamine in the rat brain. *Brain Res.* 235; 93-103

Riddle E.L., Fleckenstein A.E., Hanson G.R. (2006). Mechanisms of methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. *AAPS J.* 8; 413-418

Rideout HJ, Larsen KE, Sulzer D, Stefanis L. (2001) Proteasomal inhibition leads to formation of ubiquitin/alpha-synuclein-immunoreactive inclusions in PC12 cells. *J Neurochem.* 78; 899-908

Rippeth JD , Heaton RK, Carey CL, *et al.*(2004) Methamphetamine dependence increases risk of neuropsychological impairment in HIV infected persons. *J Int Neuropsychol Soc* 10(1):1–14, 2004.

Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, *et al.* (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell.* 78; 761–771

Rothman RB, Baumann MH. (2003). Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *Eur J Pharmacol.* 479; 23-40

Roy S, Wolman L. (1969) Electron microscopic observations on the virus particles in Herpes simplexencephalitis. *J Clin Pathol.* 22; 51-59

Sampath D, Jackson GR, Werrbach-Perez K, Perez-Polo JF. (1994) Effects of nerve growth factor on glutathione peroxidase and catalase in PC12 cells. *J Neurochem.* 62; 2476-2479

Sarkar S, Floto RA, Berger Z, *et al.* (2005) Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol.* 170; 1101-1111

Schults CW. (2006) Lewy bodies. *PNAS.*; 103: 1661-1668.

Schwartz AL, Ciechanover A. (2009) Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 49; 73-96.

Schworer CM, Shiffer KA, Mortimore GE. (1981) Quantitative relationship between autophagy and proteolysis during graded amino acid deprivation in perfused rat liver. *J Biol Chem.* 256; 7652-7658

Seiden LS e Ricaurte GA. (1987) Neurotoxicity oh methamphetamine and related drugs, in Psycopharmacology: the third generation of progress,(Mellzter,H.Y.,ed),pp. 359-366. Raven press, New York

Seiden LS, Vosmer G. (1984) Formation of 6-hydroxydopamine in caudate nucleus of the rat brain after a single large dose of methylamphetamine. *Pharmacol Biochem Behav.* 21; 29-31

Serpell LC, Berriman J, Jakes R, Goedert M, Crowther RA. (2000). Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97; 4897-4902

Sherman MY, Goldberg AL (2001) Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron*. 29; 15–32

Snyder H, Mensah K, Theisler C, Lee J, Matouschek A, Wolozin B. (2003) Aggregated and monomeric alpha-synuclein bind to the S6V proteasomal protein and inhibit proteasomal function. *J Biol Chem*. 278; 11753–11759

Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, *et al.* (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 28: 839-840

Stefanis L, Larsen KE, Rideout HJ, Sulzer D, Greene LA. (2001) Expression of A53T but not wild type α synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *J. Neurosci*. 21; 9549–9560.

Stefanova N, Klimaschewski L, Poewe W, Wenning GK, Reindl M. (2001). Glial cell death induced by overexpression of alpha-synuclein. *J Neurosci Res*. 65; 432-438

Sulzer D, Holtzman E. (1989) Acidification and endosome-like compartments in the presynaptic terminals of frog retinal photoreceptors. *J Neurocytol*. 18; 529-540

Sulzer D, Rayport S. (1990) Amphetamine and other psychostimulants reduce pH gradients in midbrain dopaminergic neurons and chromaffin granules: a mechanism of action. *Neuron*. 5; 797-808.

Sulzer D. (2001). alpha-synuclein and cytosolic dopamine: stabilizing a bad situation. *Nat Med.* 7; 1280-1282

Sulzer D., Sonders M.S., Poulsen N.W., Galli A. (2005). Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Prog Neurobiol.* 75; 406-433

Tanaka Y, Engelender S, Igarashi S, *et al.* (2001) Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum. Mol. Genet.* 10; 919–926

Thompson PM, *et.al*, (2004) Hayashi KM, Simon SL, *et al.* Structural abnormalities in the brains of human subjects who use methamphetamine. *J Neurosci* 24(26):6028–6036, 2004

Tischler AS. (2002) Chromaffin cells as models of endocrine cells and neurons. *Ann N Y Acad Sci.* 971; 366-370

Uversky VN, Fink AL. (2002). Amino acid determinants of alpha-synuclein aggregation: putting together pieces of the puzzle. *FEBS Lett.* 522; 9-13

Webb J. L., Ravikumar B., Atkins J, *et al.* (2003) α -synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J. Biol. Chem.* 278; 25009–25013.

Wang GJ., Volkow ND, Chang L, *et al.* (2004) Partial recovery of brain metabolism in methamphetamine abusers after protracted abstinence. *Am J*

Psychiatry 161(2):242–248; 2004

Wojcik C, DeMartino GN. (2003) Intracellular localization of proteasomes. *Int. J Biochem Cell Biol.* 35; 579–589

Wong ES, Tan JM, Soong WE, *et al.* (2008) Autophagy-mediated clearance of aggresomes is not a universal phenomenon. *Hum Mol Genet.* 17; 2570-2582

Youdim MB. (1991) Modulation of monoamine oxidase a activity in PC12 cells by steroids. *Eur J Pharmacol.* 192; 201-202

Vaccaro KK, Liang BT, Perelle BA, Perlman RL. (1980) Tyrosine 3-monooxygenase regulates catecholamine synthesis in pheochromocytoma cells. *J Biol Chem.* 255; 6539-6541

Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, *et al.* (2004) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science.* 304; 1158-1160

Vasseur S, Afzal S, Tardivel-Lacombe J, Park DS, Iovanna JL, Mak TW. (2009) DJ-1/PARK7 is an important mediator of hypoxia-induced cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106; 1111-1116

Volkow ND (2001) Association of dopamine transporter reduction with psychomotor impairment in methamphetamine abusers. *Am J Psychiatry* 158(3):377–382, 2001

Zhu JH, Guo F, Shelburne J, Watkins S, Chu CT. (2003) Localization of phosphorylated ERK/MAP kinases to mitochondria and autophagosomes in Lewy body diseases. *Brain Pathol.* 13; 473-481